

FR2771103

Publication Title:

Isolated DNA encoding sodium channel of the nervous system

Abstract:

Isolated DNA sequences (I) of 5908 bp (1, from rat) and 856 bp (3, human). Independent claims are also included for the following: (a) expression vector containing (I); (b) host cell transformed with this vector; (c) recombinant DNA (Ia) including a sequence derived from (I); (d) sodium channel protein (II) encoded by (I) or its allelic variants; (e) use of (II) for identifying inhibitors of sodium channel proteins that are resistant to tetrodotoxin (TTX); (f) mono- or poly-clonal antibodies (Ab) directed against (II); and (g) diagnostic kits containing (Ia) able to hybridize specifically to (I).

Data supplied from the esp@cenet database - <http://ep.espacenet.com>

BEST AVAILABLE COPY

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) Nº de publication : **2 771 103**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) Nº d'enregistrement national : **98 14551**

(51) Int Cl⁶ : C 12 N 15/12, C 12 N 5/10, 15/85, C 07 K 14/47, 16/
18, C 12 Q 1/68

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 19.11.98.

(30) Priorité : 20.11.97 US 00066225.

(71) Demandeur(s) : F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
AKTIENGESELLSCHAFT — CH.

(43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 21.05.99 Bulletin 99/20.

(72) Inventeur(s) : DIETRICH PAUL SHARTZER, FISH
LINDA MARIE, KHARE REENA, RABERT DOUGLAS
KENNETH et SANGAMESWARAN LAKSHMI.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Ce dernier n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.

(73) Titulaire(s) :

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(74) Mandataire(s) : REGIMBEAU.

(54) SEQUENCE D'ADN CODANT POUR UNE PROTEINE DE CANAL SODIQUE, SA PRODUCTION ET SON
UTILISATION.

(57) L'invention décrit l'isolement d'une nouvelle séquence
d'acide nucléique codant pour un canal sodique mammalien
dépendant du potentiel, de préférence résistant à la tétrodo-
toxine. Elle décrit également des produits polypeptidiques
d'expression recombinante de ces séquences, des vecteurs
d'expression comprenant la séquence d'ADN et des cellules
hôtes transformées par ces vecteurs d'expression. D'autres
aspects de la présente invention sont des peptides dont les
séquences sont basées sur les séquences d'aminoacides
déduites de ces séquences d'ADN, des anticorps spécifi-
ques de ces protéines et de ces peptides, des procédés
pour la détection et la détermination quantitative de telles
protéines et d'acides nucléiques correspondants. Un autre
aspect de l'invention est l'utilisation de ce canal sodique dé-
pendant du potentiel, de préférence résistant à la tétrodo-
toxine, comme cible thérapeutique pour des composés.

FR 2 771 103 - A1



Séquence d'ADN codant pour une protéine de canal sodique, sa production et son utilisation

La présente invention concerne d'une façon générale des protéines de canaux sodiques et plus particulièrement 5 une nouvelle séquence d'acide nucléique codant pour une sous-unité α mammalienne d'une protéine de canal sodique de tissu nerveux, dépendant du potentiel, de préférence résistante à la tétrodotoxine. La présente invention concerne en outre sa production par la technique de recombi- 10 naison.

L'unité de base d'information transmise d'une partie du système nerveux à une autre est un seul potentiel d'action ou influx nerveux. La "ligne de transmission" pour ces influx est l'axone ou fibre nerveuse. L'excitabilité électrique de la membrane du nerf s'est avérée 15 dépendre du système de perméabilité ionique sensible à la tension de la membrane, qui lui permet d'utiliser l'énergie emmagasinée dans des gradients de concentration ionique. L'activité électrique du nerf est déclenchée par 20 une dépolarisation de la membrane, qui ouvre à travers la membrane des canaux qui sont hautement sélectifs pour les ions sodium, qui sont ensuite entraînés vers l'intérieur par le gradient électrochimique. Parmi les nombreux canaux ioniques, le canal sodique dépendant du potentiel ou sensible au potentiel est l'un des plus étudiés. Il s'agit 25

d'une protéine transmembranaire qui est essentielle pour la production de potentiels d'action dans des cellules excitables. Un excellent article de synthèse sur les canaux ioniques est donné par Catterall, *TINS* 16(12), 500-506 (1993).

Les ADNc pour plusieurs canaux de Na^+ ont été clonés et séquencés. Numa et coll., *Annals of the New York Academy of Sciences* 479, 338-355 (1986), décrivent un ADNc provenant de l'organe électrique de l'anguille et deux 10 ADNc différents provenant du cerveau de rat. Rogart, US-A-5 380 836, décrit un ADNc provenant de tissu cardiaque de rat; voir également Rogart et coll., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 8170-8174 (1989). Les séquences de PN1 et de ses orthologues chez l'homme (hNE) et le lapin (Na^+) 15 ont été publiées [voir par exemple Klugbauer et coll., *EMBO J.* 14, 1084-1090 (1995) et Belcher et coll., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11034-11038 (1995)]. La séquence de PN1 de rat cloné à partir de ganglions de la racine dorsale (GRD) et son expression de fonction ont été 20 décrites [voir par exemple Sangameswaran et coll., *J. Biol. Chem.* 272, 14805-14809 (1997)]. D'autres canaux sodiques clonés comprennent les types I et II [Noda et coll., *Nature* 320, 188-192 (1986)], IIa [Auld et coll., *Neuron* 1, 449-461 (1988)] et III [Kayano et coll., *FEBS Lett.* 228, 187-194 (1988)] de cerveau de rat, les canaux 25 sodiques de muscle squelettique (SkM1) [Trimmer et coll., *Neuron* 3, 33-49 (1989)], NaCh6 de rat [Schaller et coll., *J. Neurosci.* 15, 3231-3242 (1995)], le canal sodique type III de nerf périphérique (rPN3) [Sangameswaran et 30 coll., *J. Biol. Chem.* 271, 5953-5956 (1996), également dénommé SNS, Akopian et coll., *Nature* 379, 257-262 (1996)], le canal atypique de rat [Felipe et coll., *J. Biol. Chem.* 269, 30125-30131 (1994)] et le canal sodique glial de rat [Akopian et coll., *FEBS Lett.* 400, 183-187 35 (1997)].

Ces études ont montré que la séquence d'aminoacides du canal sodique avait été conservée pendant une longue période d'évolution. Ces études ont également révélé que le canal était un seul polypeptide contenant quatre 5 séquences répétées internes, ou domaines homologues (domaines I-IV) ayant des séquences d'aminoacides similaires. Chaque domaine se replie en six segments transmembranaires hélicoïdaux et prédis: cinq sont des segments hydrophobes et un est un segment hautement chargé, 10 comportant de nombreux résidus lysine et arginine chargés positivement. Ce segment hautement chargé est le quatrième segment transmembranaire dans chaque domaine (le segment S4) et est susceptible d'être impliqué dans l'activation par le potentiel. Les chaînes latérales chargées 15 positivement sur le segment S4 sont susceptibles de s'apparier avec les chaînes latérales chargées négativement sur les cinq autres segments, de sorte que la dépolarisation de la membrane peut déplacer la position d'une hélice par rapport à l'autre, ce qui ouvre le canal. Des sous- 20 unités accessoires peuvent modifier la fonction du canal.

On a découvert l'utilité thérapeutique de matériels recombinants issus de l'ADN des nombreux canaux sodiques. Par exemple, US-A-5 132 296 (Cherksey) décrit des canaux 25 sodiques purifiés qui se sont révélés utiles en tant qu'outils diagnostiques et thérapeutiques.

Des isoformes de canaux sodiques sont divisées en "sous-familles". On utilise le terme "isoforme" pour désigner des protéines de canaux sodiques distinctes mais étroitement apparentées, c'est-à-dire celles ayant une 30 homologie d'aminoacides d'environ 60-80 %. Ces dernières manifestent également une forte homologie de fonctions. On utilise le terme "sous-familles" pour désigner des canaux sodiques distincts qui ont une homologie d'aminoacides d'environ 80-95 %. On utilise des combinaisons de plusieurs facteurs pour déterminer les distinctions au sein 35

d'une sous-famille, par exemple, la rapidité d'un canal, la localisation chromosomique, les données d'expression, l'homologie avec d'autres canaux au sein d'une même espèce, et l'homologie avec un canal de la même sous-
5 famille entre des espèces différentes. Une autre considération est une affinité pour la tétrodotoxine ("TTX"). La TTX est une toxine très puissante provenant du tétrodon, ou poisson-globe, qui bloque la transmission des influx nerveux le long des axones et dans les membranes exci-
10 tables des fibres nerveuses. La TTX se fixe au canal sodique et arrête le flux des ions sodium.

Des études utilisant la TTX comme sonde ont éclairé beaucoup le mécanisme et la structure des canaux sodiques. Il existe trois sous-types de canaux sodiques qui sont
15 définis par l'affinité pour la TTX, qui peut être mesurée par les valeurs de la CI_{50} : canaux sodiques sensibles à la TTX ($CI_{50} = 1-30 \text{ nM}$), canaux sodiques insensibles à la TTX ($CI_{50} = 1-5 \mu\text{M}$) et canaux sodiques résistants à la TTX ($CI_{50} \geq 50 \mu\text{M}$).

20 Les potentiels d'action insensibles à la TTX ont été étudiés d'abord dans le muscle squelettique de rat [Redfern et coll., *Acta Physiol. Scand.* 82, 70-78 (1971)]. Ces potentiels d'action ont été ensuite décrits dans d'autres tissus mammaliens, y compris le muscle squelet-
25 tique mammalien de nouveau-né, le muscle cardiaque mamma- lien, des cellules de ganglions de la racine dorsale de souris *in vitro* et en culture, des cellules L6 et de muscle squelettique mammalien en culture [voir Rogart, *Ann. Rev. Physiol.* 43, 711-725 (1980)].

30 Les neurones des ganglions de la racine dorsale de rat possèdent à la fois des courants de canaux sodiques sensibles à la TTX ($CI_{50} \sim 0,3 \text{ nM}$) et des courants de canaux sodiques résistants à la TTX ($CI_{50} \sim 100 \mu\text{M}$), comme décrit par Roy et coll. dans *J. Neurosci.* 12, 2104-2111
35 (1992)]. On a également mesuré des courants sodiques

résistants à la TTX dans des ganglions pétreux et des ganglions plexiformes de rat [voir Ikeda et coll., *J. Neurophysiol.* 55, 527-539 (1986) et Stea et coll., *Neurosci.* 47, 727-736 (1992)]. Les électrophysiologistes pensent 5 qu'un autre canal sodique résistant à la TTX reste à découvrir.

Bien que l'on connaisse des ADNc provenant de cerveau, de cœur et de muscle squelettique de rat, l'identification et l'isolement d'ADNc à partir de tissu nerveux 10 sensitif périphérique, tel que des ganglions de la racine dorsale, ont été générés par la difficulté du travail avec un tel tissu.

La présente invention fournit de nouvelles séquences purifiées et isolées d'acide nucléique, codant 15 pour des protéines de canaux sodiques de tissu nerveux, de préférence résistantes à la TTX, qui sont fortement exprimées dans des ganglions plexiformes et des ganglions de la racine dorsale de l'adulte, moins fortement exprimées dans le cerveau, la moelle épinière et les ganglions cervicaux 20 supérieurs, et ne sont pas exprimées dans le nerf sciatique, le cœur ou le muscle squelettique. Sous des formes actuellement préférées, les nouvelles séquences d'ADN comprennent des séquences d'ADNc codant pour la protéine de canal sodique de tissu nerveux de rat. Un aspect de la 25 présente invention est la sous-unité α de cette protéine de canal sodique.

L'invention a également pour objet l'ADN, l'ADNc et l'ARNm issus des séquences d'acide nucléique de l'invention, et l'ARNc issu de l'ARNm. En particulier, deux 30 séquences d'ADNc ensemble codent pour le canal sodique entier de tissu nerveux de rat.

La présente invention englobe également d'autres formes d'ADN, telles que de l'ADN génomique, de l'ADN préparé par synthèse chimique partielle ou totale à partir de 35 nucléotides, et de l'ADN comportant des délétions ou des

mutations.

Encore un autre aspect de l'invention est la nouvelle protéine de canal sodique de rat, résistante à la TTX, et des fragments de celle-ci, codés par l'ADN de la 5 présente invention.

Un autre aspect de la présente invention consiste en des polynucléotides et oligonucléotides recombinants comprenant une séquence d'acide nucléique issue de la séquence d'ADN de la présente invention.

10 Un autre aspect de l'invention est un procédé de stabilisation de l'ADNc entier qui code pour la séquence de la protéine de l'invention.

15 Un autre aspect de l'invention comprend des vecteurs d'expression comprenant l'ADN de l'invention, des cellules hôtes transformées ou transfectées par ces vecteurs et une banque d'ADNc de ces cellules hôtes.

20 La présente invention englobe également un essai pour la détection d'inhibiteurs de la protéine de canal potassique, comprenant la mise en contact d'un composé, soupçonné être un inhibiteur, avec un canal sodique exprimé, et la mesure de l'activité du canal sodique.

25 On fournit en outre un procédé d'inhibition de l'activité du canal sodique résistant à la TTX, comprenant l'administration d'une quantité efficace d'un composé ayant une valeur CI_{50} de 10 μM ou moins.

De plus, on fournit des procédés d'utilisation de l'ADN pour la production d'anticorps monoclonaux et d'anticorps polyclonaux, destinés à être utilisés en tant que cibles moléculaires pour la découverte de médicaments, 30 en tant que marqueurs hautement spécifiques d'antigènes spécifiques, comme molécules détectrices, dans des essais diagnostiques, et pour des utilisations thérapeutiques, telles que le soulagement de la douleur, en tant que sonde du canal PNS dans un autre tissu mammalien, dans la conception d'agents thérapeutiques et dans le criblage de 35

thérapies.

La présente invention est illustrée à l'aide des dessins ci-annexés. Sur ces dessins:

Les figures 1A-E représentent la séquence native 5 d'ADNc de 5 908 nucléotides codant pour le canal sodique type 5 ("PN5") de rat (SEQ ID n° 1), issu de deux clones d'ADNc chevauchants, désignés par 26.2 et 1.18.

Les figures 2A-F représentent la séquence d'amino-acides déduite de PN5 (SEQ ID n° 2, représentée dans le 10 code d'aminoacides à trois lettres). Les figures 2G-H, représentant la séquence d'aminoacides déduite de PN5 dans le code d'aminoacides à une seule lettre, montrent également les domaines homologues (I-IV); les segments trans-membranaires (S1-S6) supposés; l'aminoacide conférant la 15 résistance à TTX (♦); les sites de N-glycosylation (•); le site de phosphorylation à la protéine kinase A (PKA) dépendant de cAMP (○) et le codon de terminaison (*).

La figure 3A représente une séquence de 856 paires 20 de bases pour le PN5 humain (SEQ ID n° 3). La figure 3B représente la comparaison de séquence d'aminoacides du fragment hPN5 avec le PN5 de rat.

La figure 4 représente la séquence de la nouvelle sonde de domaine IV de canal sodique (SEQ ID n° 4).

Les figures 5A-E représentent la séquence de 25 5 334 nucléotides modifiée pour la stabilité et l'expression (SEQ ID n° 5). Les nucléotides 24 à 5 518 constituent la région de 5 295 pb codant pour une protéine à 1 765 aminoacides.

La figure 6 représente la carte de clonage de PN5.

La présente invention concerne une séquence d'acide 30 nucléique purifiée et isolée codant pour une nouvelle protéine de canal sodique mammalienne, de préférence résistante à la TTX. L'expression "ADN purifié et isolé" signifie de l'ADN qui est essentiellement exempt, c'est-à-dire 35 contient moins d'environ 30 %, de préférence moins d'envi-

ron 10 %, et encore mieux de préférence moins d'environ 1 %, de l'ADN auquel est associé à l'état naturel l'ADN d'intérêt. Les techniques pour déterminer la pureté sont bien connues dans le domaine et comprennent, par exemple,
5 la cartographie de restriction, l'électrophorèse en gel d'agarose et la centrifugation en gradient de CsCl.

Le terme "ADNc" est destiné à comprendre l'ADNc, ou ADN complémentaire, qui consiste en séquences d'ADN simple brin ou double brin, produites par transcription inverse
10 d'ARNm isolé à partir d'une cellule donneuse ou par synthèse chimique. Par exemple, le traitement d'ARNm par une transcriptase inverse, telle que la transcriptase inverse d'AMV ou la transcriptase inverse de M-MuLV, en présence d'une amorce oligonucléotidique, donnera un duplex ARN-ADN
15 pouvant être traité par de la RNase H, de l'ADN polymérase et de l'ADN ligase, pour donner de l'ADNc double brin. Si on le désire, l'ADNc double brin peut être dénaturé par des techniques classiques, telles qu'un chauffage, pour donner de l'ADNc simple brin. Le terme "ADNc" comprend de
20 l'ADN qui est une copie complémentaire de l'ARNm existant dans la nature, ainsi que des copies complémentaires de variants de l'ARNm existant dans la nature, qui ont la même activité biologique. Les variants comprennent, par exemple, des insertions, des délétions, des séquences à
25 codons dégénérés et des allèles.

Un "ARNc" correspondant à l'ARNm transcrit à partir d'une séquence d'ADN codant pour la sous-unité α d'une nouvelle protéine de canal sodique, de préférence résistante à la TTX, est envisagé par la présente invention.
30 Le terme "ARNc" désigne un ARN qui est une copie de l'ARNm transcrit par une cellule.

En particulier, l'invention englobe de l'ADN comportant les versions natives des séquences nucléotidiques indiquées sur les figures 1A-E (SEQ ID n° 1), désigné ici
35 par canal sodique type 5 (PNS). Les figures 1A-E repré-

sentent le produit de construction d'ADNC à 5 908 nucléotides, comprenant un cadre de lecture ouvert de 5 298 bases (y compris le codon d'arrêt) (SEQ ID n° 1). Le résidu nucléotidique 79 représente le site d'initiation 5 et de traduction, et le résidu 5367 représente la fin du codon d'arrêt.

L'invention englobe également des versions modifiées de PNS, et en particulier la version représentée sur les figures 5A-E (SEQ ID n° 5). Le clone *SalI-XbaI* de 10 5 334 nucléotides est dépourvu de la plupart des séquences non traduites, du cadre de lecture ouvert de 5 298 nucléotides partant du nucléotide 24 et se terminant au nucléotide 5321. Les codons d'initiation et d'arrêt sont soulignés, comme le sont les mutations traductionnellement 15 silencieuses au niveau des nucléotides 3932, 3935, 3941, 3944 et 3947, qui ont été introduites pour bloquer un réarrangement dans cette région pendant la croissance dans *E. coli*.

La séquence nucléotidique de SEQ ID n° 1 20 (figures 1A-E) correspond aux ADNC de rat. Une recherche d'homologie a montré que le canal sodique le plus étroitement apparenté se trouvait dans le canal cardiaque de rat, avec une homologie de 72,5 %. Les canaux les plus étroitement apparentés qui viennent ensuite sont rPN1, avec 72 %, 25 et les types I et III de cerveau de rat, avec 71,8 % et 71,3 %, respectivement. Les homologies avec rPN3a, hPN3, rPN4, rPN4a, le type II de cerveau de rat et le muscle squelettique de rat vont chacune environ de 70 à 71 %.

En outre, un clone de 856 paires de bases (SEQ ID 30 n° 3), tel que représenté sur la figure 3A, a été isolé à partir d'une banque d'ADNC de ganglions de la racine dorsale (GRD) humains, et est étroitement apparenté à la séquence d'aminoacides de PNS de rat, avec une identité de 79 % et une homologie de 86 %. La séquence de PNS humain 35 couvre la région entre IIIS1 et l'interdomaine III/IV, qui

- 10 -

inclus la vanne d'inactivation rapide (à savoir IFM) qui est localisée dans l'interdomaine III/IV.

Le terme "banque d'ADNc" désigne une collection de clones, habituellement dans un bactériophage ou, moins 5 communément, dans des plasmides bactériens, contenant des copies d'ADNc de séquences d'ARNm issues d'une cellule donneuse ou d'un tissu donneur.

On pense que les homologues supplémentaires du nouveau canal sodique de rat, résistant à la TTX, décrit ici, 10 sont également exprimés dans un autre tissu mammalien.

L'analyse northern blot (exemple 5) indique que PN5 est codé par un transcrit de ~ 6,5 kb.

La séquence d'aminoacides déduite de PN5, représentée sur les figures 2A-F (SEQ ID n° 2), manifeste les 15 caractéristiques structurales primaires d'une sous-unité α d'un canal sodique dépendant du potentiel, résistant à la TTX. Les figures 2G-H représentent les domaines homologues (I-IV); les segments transmembranaires (S1-S6) supposés; l'aminoacide conférant la résistance à la TTX (\blacklozenge); les 20 sites de N-glycosylation (\bullet); et les sites de phosphorylation à la PKA cAMP-dépendants (\circ). Des séquences d'ADN codant pour les polypeptides de protéine de canal sodique identiques, analogues ou variants allèles du système nerveux, par utilisation, au moins en partie, de codons dégénérés, sont également envisagées par la présente invention. 25

Une caractéristique intéressante de cette séquence d'aminoacides déduite est que l'aminoacide qui est le plus responsable de la sensibilité à la TTX est localisé à la position 355 et n'est pas aromatique. Dans les canaux 30 sodiques de type du cerveau humain et de rat, dans le canal du muscle squelettique et dans PN1 et PN4, cet aminoacide est la tyrosine ou la phénylalanine, et ces canaux sont tous sensibles à la TTX. Dans PN3 et PN5, l'aminoacide est la sérine. Etant donné que PN3 est très 35 résistant à la TTX, l'implication est que PN5 est égale-

ment un canal résistant à la TTX. Le canal cardiaque comporte un résidu cystéine à cette position et est "insensible" à la TTX.

Bien que PN5 contienne toutes les caractéristiques

5 distinctives d'un canal sodique dépendant du potentiel, il a des caractéristiques structurales spécifiques qui le distinguent des autres canaux sodiques. Par exemple, DIIIS4 comporte 5 aminoacides basiques conservés dans tous les canaux sodiques qui pourraient jouer un rôle significatif

10 dans les aspects de détection de potentiel de la fonction de canal. Dans PN5, le premier aminoacide basique est remplacé par un résidu alanine. De même, dans DIIIS4, PN5 comporte 5 aminoacides basiques au lieu des six qui sont présents dans d'autres séquences de canaux sodiques, le

15 dernier résidu arginine étant remplacé par un résidu glutamine.. Dans DIIIS3, le segment transmembranaire ne contient que 18 aminoacides, par opposition à 22 aminoacides dans les autres canaux. En outre, la courte boucle de liaison (4 aminoacides) entre S3 et S4 dans DIII est même

20 plus courte, en raison d'une délétion de 3 aminoacides. Ce raccourcissement de S3 et de la boucle de liaison a été confirmé par la conception d'amorces dans la région appropriée de la séquence pour un essai de RT-PCR (réaction d'amplification en chaîne par polymérase-transcription

25 inverse) à partir de GRD de rat, et séquençage du fragment d'ADN amplifié. Un tel essai a été effectué pour confirmer la séquence d'une autre région de PN5, dans la boucle DIVS5-S6, où il y avait une délétion d'un peptide de 8 aminoacides.

30 On a effectué une analyse de distribution tissulaire d'ARN, par une réaction d'amplification en chaîne par polymérase-transcription inverse (RT-PCR amorcée par oligonucléotide), à partir des systèmes nerveux périphérique et central de rat, en particulier à partir de GRD de

35 rat. On a étudié huit types de tissus principaux quant à

l'expression des gènes PN5 spécifiques correspondants aux positions 5651-5903 de SEQ ID n° 1 (figures 1A-E). L'ARNm de PN5 était présent dans cinq des tissus étudiés: le cerveau, la moelle épinière, GRD, les ganglions plexiformes et les ganglions cervicaux supérieurs. PN5 n'était pas présent dans les tissus restants étudiés: le tissu de nerf sciatique, le tissu de muscle squelettique ou cardiaque. PN5 s'est révélé être le plus fort dans GRD et les ganglions plexiformes, ce qui a conduit les demandeurs à penser que le GRD était enrichi en PN5. PN5 présente des différences considérables d'abondance parmi un ensemble de tissus. PN5 a un gradient d'expression avec une forte expression dans les GRD. PN5 a un gradient d'expression comme les autres canaux, mais une distribution plus limitée.

L'invention comprend non seulement la protéine entière exprimée par les séquences d'ADNc de SEQ ID n° 1, 2 et 3, mais comprend également des fragments de protéines. Ces fragments peuvent être obtenus par coupure des protéines entières ou par l'utilisation de plus courtes séquences d'ADN ou de plus courts polynucléotides, pour exprimer le fragment recherché.

Tel qu'utilisé ici, le terme "polynucléotide" désigne une forme polymère de nucléotides de longueur quelconque, qu'il s'agisse de ribonucléotides ou de désoxyribonucléotides. Ce terme désigne seulement la structure primaire de la molécule. Ainsi, ce terme comprend de l'ADN simple brin et de l'ADN double brin, ainsi que de l'ARN double brin et de l'ARN simple brin. Il comprend également des formes modifiées, par exemple par méthylation et/ou par coiffage, et des formes non modifiées du polynucléotide.

En outre, le terme "polynucléotide" est destiné à comprendre un polynucléotide recombinant qui est d'origine génomique, d'ADNc, semi-synthétique ou synthétique, qui,

en vertu de son origine ou d'une manipulation, n'est pas associé à la totalité ou une partie du polynucléotide auquel il est associé dans la nature et/ou est lié à un polynucléotide autre que celui auquel il est lié dans la
5 nature.

En conséquence, l'invention comprend également des polynucléotides qui peuvent être utilisés pour produire des polypeptides ayant une longueur d'environ 10 à 1 500, de préférence de 10 à 100 aminoacides. L'isolement et la
10 purification de tels polypeptides recombinants peuvent être effectués par des techniques qui sont bien connues dans le domaine, par exemple des séparations chromatographiques préparatives ou la chromatographie d'affinité. En outre, des polypeptides peuvent également être produits
15 par des moyens synthétiques qui sont bien connus dans la technique....

L'invention permet la manipulation de matériels génétiques par des techniques de recombinaison, pour produire des polypeptides qui possèdent les caractéristiques
20 structurales et fonctionnelles de la nouvelle sous-unité α de canal sodique dépendant du potentiel, résistante à la TTX, rencontrée dans des nerf sensitifs. On peut utiliser la mutagénèse dirigée sur site pour obtenir de tels polypeptides recombinants. Par exemple, on peut insérer spécifiquement des oligonucléotides synthétiques, ou les mettre
25 spécifiquement à la place d'oligonucléotides existants, dans le segment du gène d'intérêt, pour produire des gènes codant pour et exprimant un mutant spécifique. On peut également insérer des oligonucléotides dégénérés au hasard
30 et on peut utiliser des techniques de visualisation de phages pour identifier et isoler des polypeptides ayant une propriété fonctionnelle d'intérêt.

En outre, la présente invention envisage des polynucléotides recombinants ayant une longueur d'environ 15 à
35 20 kb, de préférence de 10 à 15 kb, comprenant une

séquence d'acide nucléique issue de l'ADN de l'invention.

Le terme "issu" d'une séquence désignée se réfère à une séquence d'acide nucléique qui est composée d'une séquence d'environ au moins 6 à 8 nucléotides, de préférence d'au moins 10 à 12 nucléotides et en particulier d'au moins 15 à 20 nucléotides qui correspondent à une région de la séquence désignée, c'est-à-dire sont homologues ou complémentaires de celle-ci. La séquence dérivée n'est pas nécessairement dérivée physiquement de la séquence nucléotidique indiquée, mais peut être issue d'une autre manière, y compris, par exemple, la synthèse chimique ou la réplication d'ADN ou la transcription inverse, techniques qui sont basées sur l'information fournie par les séquences de base dans la ou les régions desquelles est issu le polynucléotide.

Un test d'expression néonatal a été effectué avec F11, une lignée de cellules de fusion conçue à partir de GRD de rat nouveau-né, soudée à une lignée cellulaire de souris, N18TG, provenant de Massachusetts General Hospital. F11 répond à des agents trophiques, tels que le NGF (facteur de croissance des neurones), par extension de dendrites. On a constaté que PNS était présent à la fois dans F11 native et F11 traitée par NGF, ce qui a conduit les demandeurs à penser que le canal sodique était exprimé à l'état natif dans F11.

Une hybridation *in situ* d'ARNm de PNS avec un tissu de GRD de rat donne une localisation principalement dans les petits neurones et les neurones moyens, avec une absence dans les neurones de grande taille.

On a également cartographié PNS jusqu'à sa localisation cytogénétique sur des préparations de chromosomes de souris. PNS est localisé sur le même chromosome que le canal cardiaque et PN3.

En général, les canaux sodiques comprennent une sous-unité α et deux sous-unités β . Les sous-unités β

peuvent moduler la fonction du canal. Toutefois, étant donné que la sous-unité α est tout ce qui est requis pour que le canal soit totalement fonctionnel, l'expression de l'ADNC dans SEQ ID n° 1 (figures 1A-E) donnera une protéine totalement fonctionnelle. Le gène codant pour la sous-unité β_1 dans le tissu de nerf périphérique s'est révélé être identique à celui rencontré dans le cœur, le cerveau et le muscle squelettique de rat. L'ADNC de la sous-unité β_1 n'est pas décrit ici, puisqu'il est bien connu dans la technique [voir Isom et coll., *Neuron* 12, 1183-1194 (1994)]. Toutefois, il doit être entendu qu'en combinant la séquence connue codant pour la sous-unité β_1 avec la séquence de la sous-unité α décrite ici, il est possible d'obtenir un canal sodique PNS complet, dépendant du potentiel, de préférence résistant à la TTX.

La présente invention comprend également des vecteurs d'expression comprenant l'ADN ou l'ADNC décrit plus haut, des cellules hôtes transformées par ces vecteurs d'expression, capables de produire le canal sodique de l'invention, ainsi que des banques d'ADNC comprenant de telles cellules hôtes.

Le terme "vecteur d'expression" signifie tout élément génétique, par exemple un plasmide, un chromosome, un virus, se comportant comme une unité autonome d'expression de polynucléotide dans une cellule ou étant rendu capable de réPLICATION par insertion dans un chromosome d'une cellule hôte, et auquel est attaché un autre segment poly-nucléotidique, de manière à provoquer la réPLICATION et/ou l'expression du segment attaché. Des vecteurs appropriés comprennent, mais sans se limiter à ceux-ci, des plasmides, des bactériophages et des cosmides. Les vecteurs contiendront les séquences polynucléotidiques qui sont nécessaires pour effectuer la ligature ou l'insertion du vecteur dans une cellule hôte désirée et pour effectuer l'expression du segment attaché. De telles séquences dif-

fèrent en fonction de l'organisme hôte ou comprendront des séquences de promoteurs pour effectuer la transcription, des séquences d'activateurs pour accroître la transcription, des séquences de sites de liaison au ribosome et
5 des séquences de terminaison de transcription et de traduction.

L'expression "cellule hôte" se réfère en général à des organismes procaryotes ou eucaryotes et comprend tout organisme apte à la transformation ou à la transfection,
10 qui est capable d'exprimer une protéine et peut être, ou a été, utilisé en tant que receveur de vecteurs d'expression ou d'autre ADN transféré. On peut également contraindre des cellules hôtes à exprimer une protéine par injection directe d'ARNc exogène, pouvant être traduit en la protéine d'intérêt. Une cellule hôte préférée est l'ovocyte de *Xenopus*.

Le terme "transformé" se réfère à toute méthode connue pour l'insertion de séquences d'ADN ou d'ARN étranger dans une cellule hôte procaryote. Le terme "transfecté" se réfère à toute méthode connue pour l'insertion de séquences d'ADN ou d'ARN étranger dans une cellule hôte eucaryote. De telles cellules transformées ou transfectées comprennent des cellules transformées ou transfectées de façon stable, dans lesquelles l'ADN inséré est rendu
25 capable de réPLICATION dans la cellule hôte. Elles comprennent également des cellules exprimant temporairement, qui expriment pendant des durées limitées l'ADN ou l'ARN inséré. La technique de transformation ou de transfection dépend de la cellule hôte qui est transformée. Elle peut
30 comprendre l'encapsidation du polynucléotide dans un virus ainsi que l'introduction directe du polynucléotide, comme par exemple par lipofection ou micro-injection. La transformation ou la transfection peut entraîner l'incorporation de l'ADN inséré dans le génome de la cellule hôte ou
35 le maintien de l'ADN inséré dans la cellule hôte, sous

forme de plasmide. Des méthodes de transformation sont bien connues dans la technique et comprennent, mais sans se limiter à celles-ci, l'infection virale, l'électroporation, la lipofection et l'introduction directe provoquée par le phosphate de calcium.

Il doit être entendu que la présente invention est destinée à inclure d'autres formes de vecteurs d'expression, de cellules hôtes et de techniques de transformation servant à des fonctions équivalentes et bien connues dans la technique.

L'invention concerne également un essai d'inhibiteurs de la nouvelle protéine de canal sodique résistante à la TTX, comprenant la mise en contact d'un composé, soupçonné être un inhibiteur, avec un canal sodique exprimé, et la mesure de l'activité du canal sodique. Le composé peut être un composé pratiquement pur d'origine synthétique, mis en contact dans un milieu aqueux, ou le composé peut être une substance existant dans la nature, de sorte que le milieu d'essai est un extrait d'origine biologique, comme par exemple un extrait de cellules végétales, animales ou microbiennes. L'activité PN5 peut être mesurée par des méthodes telles que l'électrophysiologie (mise sous tension à l'aide de deux électrodes ou mise sous tension par patch clamp de cellules entières à l'aide d'une seule électrode), essais de flux d'ions guanidinium et essais de liaison à des toxines. Un "inhibiteur" est défini en général par la quantité entraînant une diminution de plus de 50 % de l'activité PN5, de préférence une diminution de plus de 70 % de l'activité PN5, encore mieux une diminution de plus de 90 % de l'activité PN5.

Il existe de nombreuses utilisations de l'invention, dont quelques unes sont décrites ci-dessous:

1. Sonde pour canaux mammaliens

Comme mentionné plus haut, on pense que des homologues supplémentaires du nouveau canal sodique de rat

résistant à la TTX, décrit ici, sont également exprimés dans un tissu mammalien, en particulier dans un tissu humain. On peut utiliser comme sonde les ADNC entiers de canaux sodiques PN5 de rat de la présente invention pour 5 découvrir s'il existe dans le tissu humain de nouveaux canaux sodiques supplémentaires, dépendants du potentiel, de préférence résistants à la TTX, et, s'ils existent, pour faciliter l'isolement des ADNC codant pour la protéine humaine.

10 Les homologues humains des canaux PN5 de rat, résistants à la TTX, peuvent être clonés à l'aide d'une banque d'ADNC de GRD humain. Les GRD humains sont obtenus lors d'une autopsie. On homogénéise le tissu congelé et on extrait l'ARN avec de l'isothiocyanate de guanidine
15 [Chirgwin et coll., *Biochemistry* 18, 5294-5299 (1979)]. L'ARN est fractionné en fonction de la taille sur un gradient de saccharose, pour l'enrichissement en ARNm de grande taille, car les sous-unités α du canal sodique sont codées par des transcrits de grande taille (7-11 kb). On
20 prépare de l'ADNC double brin en utilisant le nécessaire d'ADNC SuperScript Choice (GIBCO BRL) avec de l'oligo(dT) ou des amorces hexamères au hasard. On ligature les segments de liaison EcoRI sur l'ADNC double brin, qui est ensuite phosphorylé. On construit la banque d'ADNC par
25 ligature de l'ADNC double brin dans le vecteur bactériophage λ ZAP II (Stratagene), suivie d'encapsidation dans des particules phagiques.

On étale les phages sur des plaques de 150 mm, sur un tapis de bactéries XLI-Blue MRF' (Stratagene) et on
30 fait des répliques des plages sur des membranes en Nylon Hybond N (Amersham). Les filtres sont hybridés avec des sondes d'ADNC de PN5 de rat, par des techniques classiques, et détectés par autoradiographie ou chimiluminescence. Le signal produit par les sondes PN5 de rat s'hybridant avec des clones humains positifs, à une forte

stringence, devrait être plus fort que ceux obtenus avec des sondes de canal sodique de cerveau de rat s'hybridant avec ces clones. Les plages positives sont purifiées davantage par dilution limitante et criblées à nouveau par 5 hybridation ou PCR. La cartographie de restriction et la réaction d'amplification en chaîne par polymérase identifieront des clones chevauchants qui peuvent être assemblés par des techniques classiques en l'homologue humain complet de PNS de rat. Le clone humain peut être exprimé par 10 injection d'ARNc transcrit in vitro à partir du clone d'ADNc complet dans des ovocytes de *Xenopus*, ou par transfection d'une lignée cellulaire mammalienne avec un vecteur contenant l'ADNc lié à un promoteur approprié.

2. Anticorps contre PNS

15 Les polypeptides de l'invention sont très utiles pour la production d'anticorps dirigés contre PNS. Ces anticorps peuvent être utilisés dans une chromatographie d'affinité pour purifier des protéines recombinantes ou des polypeptides recombinants de canaux sodiques, ou ils 20 peuvent être utilisés en tant qu'outil de recherche. Par exemple, des anticorps fixés à une molécule porteuse peuvent être utilisés dans des techniques de coloration histochimique, pour identifier d'autres tissus et d'autres types cellulaires dans lesquels les PNS sont présents, ou 25 ils peuvent être utilisés pour identifier des régions fonctionnelles ou d'épitopes de la protéine de canal sodique de l'invention.

Les anticorps peuvent être monoclonaux ou polyclonaux et peuvent être produits par des techniques qui 30 sont bien connues dans le domaine. Des anticorps polyclonaux sont produits comme suit: on utilise un conjugué immunogène, comprenant PNS ou un fragment de celui-ci, éventuellement lié à une protéine porteuse, pour immuniser un mammifère choisi, tel que la souris, le rat, la chèvre, 35 etc. On recueille et traite selon des techniques connues

du sérum provenant du mammifère immunisé, pour séparer la fraction d'immunoglobuline.

Des anticorps monoclonaux sont produits par la technique classique d'hybridomes, basée sur celle rapportée par Kohler et Milstein dans *Nature* 256, 495-497 (1975). Des cellules spléniques sont obtenues à partir d'un animal hôte immunisé avec la protéine PNS ou un fragment de celle-ci, éventuellement liées à une substance porteuse. Des cellules hybrides sont formées par fusion de ces cellules spléniques avec une lignée de myélome appropriée, et cultivées. Les anticorps produits par les cellules hybrides sont criblés en fonction de leur aptitude à se lier à des protéines PNS exprimées.

On peut utiliser un certain nombre de techniques de criblage bien connues dans le domaine, comme par exemple des méthodes de criblage par essai immunoenzymatique direct ou indirect utilisant un corps adsorbé. On soumet ensuite les cellules hybrides produisant de tels anticorps à un reclonage ou à des conditions de forte dilution, afin de sélectionner une cellule hybride secrétant une population homogène d'anticorps spécifiques de l'une ou l'autre protéine de PNS.

En outre, des anticorps peuvent être suscités par clonage et expression de séquences nucléotidiques ou de versions mutées de celles-ci, codant au moins pour les séquences d'aminoacides requises pour la fixation spécifique d'anticorps naturels, et ces protéines exprimées peuvent être utilisées en tant qu'immunogènes. Les anticorps peuvent comprendre l'immunoglobuline complète ou un fragment de celle-ci. Les anticorps peuvent être liés à un groupe rapporteur, comme décrit plus haut à propos des polynucléotides.

L'exemple 10 illustre la mise en pratique de la production d'un anticorps.

3. Cibles thérapeutiques pour des composés pour le traitement de troubles et essais de ceux-ci

La présente invention englobe également l'utilisation de la nouvelle sous-unité α de canal sodique dépendant du potentiel, de préférence résistante à la TTX, en tant que cible thérapeutique pour des composés destinés au traitement de troubles du système nerveux, sur la base des données de localisation de RT-PCR. Les troubles comprennent, mais sans se limiter à ceux-ci, l'épilepsie, une 10 lésion due à une attaque cérébrale, une lésion cérébrale, la neuropathie diabétique, une lésion traumatique, la douleur neuropathique chronique et la neuropathie associée au SIDA.

4. Conception d'agents thérapeutiques à base de PN5 inhibiteur et essais de ceux-ci

La présente invention est également orientée vers ... l'inhibition de l'activité de PN5 dans des tissus du cerveau, de la moelle épinière, de ganglions de la racine dorsale, de ganglions plexiformes et de ganglions cervicaux supérieurs. Toutefois, il doit être entendu que des études ultérieures peuvent révéler que PN5 est présent dans d'autres tissus, et, en tant que tels, ces tissus peuvent également être des zones cibles. Par exemple, la détection d'ARNm de PN5 dans des ganglions plexiformes 25 suggère que PN5 peut conduire des courants de sodium résistants à la TTX dans ces ganglions et d'autres ganglions sensibles du système nerveux.

En outre, il s'est avéré que des protéines qui ne sont pas normalement exprimées dans certains tissus sont 30 exprimées dans un état pathologique. En conséquence, la présente invention est destinée à englober l'inhibition de PN5 dans des tissus et des types cellulaires dans lesquels la protéine est normalement exprimée, et dans des tissus et des types cellulaires dans lesquels la protéine n'est 35 exprimée qu'au cours d'un état pathologique.

Par exemple, on pense que des canaux sodiques résistants à la TTX jouent un rôle clé dans la transmission d'flux nerveux en relation avec des signaux sensoriels tels que la douleur et la pression. Cette information facilitera la conception d'agents thérapeutiques qui peuvent être ciblés vers une zone déterminée, telle qu'un tissu nerveux périphérique.

La protéine recombinante de la présente invention peut être utilisée pour l'essai d'agents thérapeutiques potentiels ayant l'aptitude à inhiber le canal sodique d'intérêt. En particulier, elle serait utile pour inhiber sélectivement la fonction de canaux sodiques dans des tissus nerveux périphériques responsables de la transmission de signaux de douleur et de pression sans affecter en même temps la fonction de canaux sodiques dans d'autres tissus, tels que le cœur et le muscle. Une telle sélectivité permettrait le traitement de la douleur sans provoquer d'effets secondaires dus à des complications cardiaques ou neuromusculaires. En conséquence, il serait utile d'avoir des séquences d'ADN codant pour des canaux sodiques exprimées sélectivement dans un tissu nerveux périphérique.

5. Analgésique

Les canaux sodiques dans le tissu nerveux périphérique jouent un rôle important dans la transmission d'flux nerveux, et sont par conséquent un outil pour comprendre la transmission de la douleur neuropathique. La douleur neuropathique se répartit en deux composantes: l'allodynie, dans laquelle un stimulus normalement non douloureux devient, et l'hyperalgesie, dans laquelle un stimulus habituellement normalement douloureux devient extrêmement douloureux.

Dans des études de localisation tissulaire, l'ARNm de PNS se trouve dans les petits neurones et les neurones moyens de GRD. L'ARNm de PNS est également présent dans le cerveau et la moelle épinière. L'inhibition de ses activi-

tés peut faciliter la prévention de troubles tels que les maux de tête et les migraines. La possibilité d'inhiber l'activité de ces canaux sodiques, c'est-à-dire de réduire la conduction d'influx nerveux, affectera l'aptitude du nerf à transmettre les influx douloureux. L'inhibition sélective des canaux sodiques dans des neurones sensitifs tels que GRD permettra l'arrêt d'influx douloureux sans effets secondaires indésirables provoqués par l'inhibition des canaux sodiques dans d'autres tissus tels que le cerveau et le cœur. En outre, certaines maladies sont provoquées par des canaux sodiques qui produisent des influx à une fréquence extrêmement élevée. La possibilité de réduire l'activité du canal peut alors éliminer ou atténuer la maladie. En conséquence, on peut cibler des composés thérapeutiques potentiels par des méthodes bien connues dans la technique, pour découvrir s'ils peuvent inhiber l'activité du canal sodique recombinant de l'invention [Barram M. et coll., *Naun-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 347, 125-132 (1993), et McNeal E.T. et coll., *J. Med. Chem.* 28, 381-388 (1985)]. Pour des études similaires avec le récepteur d'acétylcholine, voir Claudio et coll., *Science* 238, 1688-1694 (1987).

Par exemple, on peut soulager la douleur par inhibition de l'activité du nouveau canal sodique, de préférence résistant à la TTX, par administration d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un composé ayant une CI_{50} d'environ $10 \mu\text{M}$ ou moins, de préférence $\leq 1 \mu\text{M}$. Des composés thérapeutiques potentiels sont identifiés sur la base de leur aptitude à inhiber l'activité de PN5. En conséquence, l'essai mentionné plus haut peut être utilisé pour identifier des composés ayant une CI_{50} thérapeutiquement efficace.

Le terme " CI_{50} " désigne la concentration d'un composé qui est requise pour inhiber à 50 % l'activité de PN5 exprimée, lorsque l'activité est mesurée par électro-

physiologie, essais de flux et essais de liaison à des toxines, comme mentionné plus haut.

6. Essais de diagnostic

Les techniques de biologie moléculaire de base utilisées dans la mise en oeuvre de la présente invention, telles que l'isolement d'ARN, d'ADN et de plasmides, la digestion par des enzymes de restriction, la construction et le sondage d'une banque d'ADNc, le séquençage de clones, la construction de vecteurs d'expression, la transformation de cellules, le maintien et le développement de cultures cellulaires et d'autres techniques générales, sont bien connues dans le domaine, et on peut trouver les descriptions de ces techniques dans des manuels généraux de laboratoire, tels que *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* par Sambrook et coll. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^e édition, 1989).

Par exemple, les polynucléotides de l'invention peuvent être liés à une "molécule rapporteuse", pour la formation d'une sonde polynucléotidique utile pour des analyses northern et Southern blot et des hybridations *in situ*.

L'expression "molécule rapporteuse" désigne une entité chimique pouvant être détectée par un moyen de détection approprié, comprenant, mais sans se limiter à ceux-ci, des moyens spectrophotométriques, chimiluminescents, immunochimiques ou radiochimiques. Les polynucléotides de la présente invention peuvent être conjugués à une molécule rapporteuse par des techniques bien connues dans le domaine. Normalement, la molécule rapporteuse contient un groupe fonctionnel approprié à l'attachement au polynucléotide ou à l'incorporation dans celui-ci. Les groupes fonctionnels appropriés à l'attachement du groupe rapporteur sont habituellement des esters activés ou des agents d'alkylation. Des détails techniques pour l'attachement de groupes rapporteurs sont bien connus dans le

domaine; voir par exemple Matthews J.A., Batki A., Hynds C. et Kricka L.J., *Anal. Biochem.* 151, 205-209 (1985) et Engelhardt et coll., EP-A-0 302 175.

La présente invention est illustrée par les
5 exemples descriptifs et non limitatifs ci-après.

Abréviations

Les abréviations suivantes sont utilisées dans les exemples et ont les significations données ci-dessous.

ASB : albumine de sérum bovin
10 EDTA: acide éthylènediaminetétraacétique, sel tétrasodique
GRD : ganglions de la racine dorsale
MEN : MOPS 20 mM, EDTA 1 mM, acétate de sodium 5 mM,
pH 7,0
15 MOPS: acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique (Sigma
Chemical Company)
PNS : canal sodique 5 de nerf périphérique
SDS : dodécylsulfate de sodium
SNP : système nerveux périphérique
20 Solution de Denhardt: 0,02 % d'ASB, 0,02 % de polyvinylpyrrolidone, 0,02 % de Ficoll (0,1 g d'ASB, 0,1 g de Ficoll, 0,1 g de polyvinylpyrrolidone pour 500 ml)
SSC : NaCl 150 mM, citrate de sodium 15 mM, pH 7,0
SSPE: NaCl 80 mM, phosphate de sodium 10 mM,
25 éthylènediaminetétraacétate 1 mM, pH 8,0
TEV : pince de tension à deux électrodes
TTX : tétrodotoxine (Sigma Chemical Company).

EXEMPLES

Les exemples ci-après illustrent la mise en pratique de l'invention.
30

Matériels

Le plasmide pBK-CMV a été obtenu auprès de Stratagene (La Jolla, CA, USA); le plasmide pBSTA est décrit par Goldin et coll. dans *Methods in Enzymology*
35 (Rudy & Iverson éditeurs) 207, 279-297; le plasmide pCInéo

a été obtenu auprès de Promega (Madison, WI, USA); et le plasmide pCRII a été obtenu auprès d'Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Le plasmide vecteur d'expression dans des ovocytes 5 pbSTA_{Cl}I_r a été construit à partir de pbSTA par insertion d'un lieu oligonucléotidique synthétique; le plasmide pKK232-8 a été obtenu auprès de Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA); le plasmide pCRII a été obtenu auprès d'Invitrogen (San Diego, CA, USA). Les lignées cellulaires de *E. coli* compétentes STBL2TM et SURE[®] ont été obtenues auprès de Gibco/BRL et Stratagene, respectivement.

EXEMPLE 1

Obtention d'ARN à partir de GRD, de cerveau et de moelle épinière de rat

Sous un microscope à dissection, on a prélevé les GRD lombaires n° 4 et n° 5 (L4 et L5), le cerveau et la moelle épinière de rats Sprague-Dawley mâles adultes anesthésiés. Les tissus ont été congelés dans de la glace carbonique et homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur Polytron; on a extrait l'ARN par la méthode à l'isothiocyanate de guanidine [voir Chomczynski et coll., *Anal. Biochemistry* 162, 156-159 (1987)]. On a dissous l'ARN total (5 µg de chaque échantillon) dans du tampon MEN contenant 50 % de formamide, 6,6 % de formaldéhyde et dénaturé à 65°C pendant 5-10 minutes. On a soumis l'ARN à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8 % contenant 8,3 % de formaldéhyde, dans du tampon MEN. Le tampon d'électrode était du tampon MEN contenant 3,7 % de formaldéhyde; on a fait fonctionner le gel à 50 V pendant 12-18 heures.

On a soumis à l'électrophorèse dans des colonnes parallèles du gel des marqueurs de taille moléculaire, comprenant les ARN ribosomiques 18S et 28S et des marqueurs d'ARN (GIBCO BRL). Leurs positions ont été détermi-

nées par coloration au bromure d'éthidium ($0,5 \mu\text{g/ml}$) de la colonne excisée, suivie d'une photographie sous lumière UV.

Après l'électrophorèse, on a rincé le gel dans SSC
5 2x et on a transféré l'ARN sur une membrane de Duralose
(Stratagene) avec SSC 20x, par action capillaire; la mem-
brane a été chauffée sous vide pendant 1 heure à 80°C.

EXEMPLE 2

Sonde provenant de IIA de cerveau de rat

10 On a synthétisé in vitro une sonde d'ARNc marquée
au ^{32}P , complémentaire des nucléotides 4637-5868 de la
séquence de sous-unité α de canal sodique IIA de cerveau
de rat, avec de l'ARN polymérase de T7 (Pharmacia), en
utilisant de l'ADN matrice de pEAF8 (Noda et coll., *Nature*
15 320, 188-192 (1986)) qui avait été linéarisé à l'aide de
*Bst*EII.

On peut trouver des protocoles pour chaque tech-
nique mentionnée ci-dessus dans *Molecular Cloning: A Labo-*
ratory Manual par Sambrook et coll. (Cold Spring Harbor
20 Laboratory Press, 2^e édition, 1989).

EXEMPLE 3

Hybridation d'ARN avec la sonde provenant de IIA de cer- veau de rat

La membrane de l'exemple 1 a été préhybridée pen-
25 dant 16 heures à 42°C dans 50 % de formamide, SSC 5x,
phosphate de sodium 50 mM, pH 7,1, solution de Denhardt
1x, 0,5 % de SDS et 1 mg/ml d'ADN de spermatozoïdes de
saumon cisaillé, dénaturé par la chaleur. La membrane a
été hybridée pendant 18 heures à 42°C dans 50 % de forma-
30 mide, SSC 5x, phosphate de sodium 50 mM, pH 7,1, solution
de Denhardt 1x, 0,5 % de SDS et 200 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN de sperma-
tozoïdes de saumon cisaillé, dénaturé par la chaleur, avec
la sonde d'ARNc marquée au ^{32}P (environ $1-3 \times 10^6 \text{ cpm/ml}$)
décrite dans l'exemple 2.

On a rincé la membrane pendant 20 minutes avec SSC 2x, 0,1 % de SDS, à la température ambiante, et on l'a ensuite lavée successivement avec SSC 2x, 0,1 % de SDS à 55°C pendant 30 minutes; SSC 0,2x, 0,1 % de SDS à 65°C 5 pendant 30 minutes; SSC 0,2x, 0,1 % de SDS à 70°C pendant 30 minutes et SSC 0,2x, 0,1 % de SDS, 0,1 % de pyro-phosphate de sodium à 70°C pendant 20 minutes. Le filtre a été exposé contre un film Kodak X-omat AR à -80°C, avec des écrans amplificateurs, pendant jusqu'à 2 semaines.

10 La sonde de pEAF8 s'est hybridée avec les ARNm dans l'échantillon de GRD, avec des tailles de 11 kb, 9,5 kb, 7,3 kb et 6,5 kb, estimées sur la base de leurs positions par rapport aux étalons.

EXEMPLE 4

15 Nouvelle sonde de domaine IV de canal sodique

La sonde a été obtenue comme suit: on a effectué une RT-PCR sur de l'ARN isolé à partir de GRD de rat, en utilisant des amorces oligonucléotides dégénérées qui étaient conçues sur la base des homologies entre les 20 canaux sodiques connus dans le domaine IV. Les produits de domaine IV ont été clonés dans un vecteur plasmidique, transformés dans *E. coli*, et on a isolé des colonies individuelles. Les produits de PCR spécifiques du domaine IV, obtenus à partir de plusieurs de ces colonies, ont été 25 séquencés individuellement. La nouvelle séquence de domaine IV clonée était la suivante (SEQ ID n° 4):

1 CTCAACATGG TTACGATGAT GGTGGAGACC GACGAGCAGG GCGAGGAGAA
51 GACGAAGGTT CTGGGCAGAA TCAACCAGTT CTTTGTGGCC GTCTTCACGG
101 GCGAGTGTGT GATGAAGATG TTCGCCCTGC GACAGTACTA TTTCACCAAC
200 151 GGCTGGAACG TGTTGACTT CATAGTGGTG ATCCTGTCCA TTGGGAGTCT
201 GCTGTTCT GCAATCCTTA AGTCACTGGA AAACTACTTC TCCCCGACGC
251 TCTTCCGGGT CATCCGTCTG GCCAGGATCG GCCGCATCCT CAGGCTGATC
301 CGAGCAGCCA AGGGGATTG CACGCTGCTC TTCGCCCTCA TGATGTCCCT
351 GCCCGCCCTC TTCAACATCG GCCTCCTCCT CTTCCCTCGTC ATGTTCATCT
35 401 ACTCCATCTT CGGCATGGCC AGCTTCGCTA ACGTCGTGGA CGAGGCCGGC

451 ATCGACGACA TGTTCAACTT CAAGACCTTT GGCAACAGCA TGCTGTGCCT
 501 GTTCCAGATC ACCACCTCGG CCGGCTGGGA CGGCCTCCTC AGCCCCATCC
 551 TCAACACGGG GCCTCCCTAC TGCGACCCCA ACCTGCCCAA CAGCAACGGC
 601 TCCCAGGGGA ACTGCAGGAG CCCGGCGGTG GGCATCATCT TCTTCACCAC
 5 651 CTACATCATC ATCTCCTTCC TCATCGTGGT CAACATGTAT ATCGCAGTCA
 701 TC

Cette séquence a été marquée au ^{32}P par amorçage au hasard.

EXEMPLE 5

10 Hybridation d'ARN avec la nouvelle sonde 3'-UTR de canal sodique

On a préparé une empreinte northern blot avec 10 μg d'ARN total provenant de cerveau, de moelle épinière et de GRD de rats. L'empreinte a été hybridée avec une sonde 15 d'ARNC provenant de la région non traduite en 3' (3'-UTR). La 3'-UTR a été clonée dans le vecteur pSP73, et l'ARNC a été transcrit à l'aide d'un nécessaire Trans Probe T (Pharmacia Biotech) et de $[^{32}\text{P}]\text{-UTP}$. L'empreinte a été préhybridée pendant 2 heures à 65°C dans une solution contenant SSC 5x, solution de Denhardt 1x, 0,5 % de SDS, phosphate de sodium 50 mM, pH 7,1, 1 mg/ml d'ADN de spermatozoïdes de saumon et 50 % de formamide. L'hybridation a été effectuée à 45°C pendant 18 heures dans la solution ci-dessus, mis à part que l'ADN de spermatozoïdes de saumon a été inclus à une concentration de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et qu'on a ajouté la sonde marquée au ^{32}P à raison de 20 35 $7,5 \times 10^5$ cpm/ml de solution. L'empreinte a été ensuite lavée trois fois avec SSC 2x et 0,1 % de SDS à la température ambiante, une fois avec SCC 0,2x et 0,1 % de SDS à 30 65°C pendant 20 minutes, et une fois avec SCC 0,2x, 0,1 % de SDS et 0,1 % de pyrophosphate de sodium à 65°C pendant 20 minutes. L'empreinte a été analysée sur un appareil PhosphoImager (BioRad), après une exposition de 2 jours. Les résultats ont indiqué qu'il y avait un signal de bande 35 de ~ 6,5 kb, présent dans le cerveau, seulement dans la

- 30 -

colonne contenant de l'ARN provenant de GRD. En raison de la faible abondance d'ARN de PNS, comme l'a montré l'essai de RT-PCR, la bande de 6,5 kb n'était pas décelable dans le cerveau ni la moelle épinière.

5

EXAMPLE 6

Construction et criblage d'une banque d'ADNc provenant de GRD de rat

On a préparé une banque d'ADNc adaptée à EcoRI à partir d'ARN poly(A)⁺ de GRD de rat Sprague-Dawley mâle 10 adulte normal, en utilisant le système SuperScript Choice (GIBCO BRL). L'ADNc (> 4 kb) a été sélectionné par fractionnement en gradient de saccharose, comme décrit par Kieffer, *Gene* 109, 115-119 (1991). L'ADNc a été ensuite ligaturé dans le vecteur Zap Express (Stratagene) et encapsidé 15 à l'aide de l'extrait d'encapsidation dans λ Gigapack II XL (Stratagene). De même, on a synthétisé une banque d'ADNc de GRD de > 2 kb.

Les phages ($3,5 \times 10^5$) ont été criblés par hybridation sur filtre avec une sonde marquée au ³²P [rBIIa, 20 bases 4637-5868 comme suit, d'Auld et coll., *Neuron* 1, 449-461 (1988)]. Les filtres ont été hybridés dans 50 % de formamide, SSPE5x, solution de Denhardt 5x, 0,5 % de SDS, 250 μ g/ml d'ADN de spermatozoïdes de saumon cisaillé, dénaturé, et phosphate de sodium 50 mM, à 42°C, et lavés 25 dans SSC 0,5x/0,1 % de SDS, à 50°C.

Des empreintes Southern blot de plasmides digérés par EcoRI ont été hybridées avec la sonde d'ADN marquée au ³²P (SEQ ID n° 4). Les filtres ont été ensuite hybridés à 42°C dans 50 % de formamide, SSC 6x, solution de Denhardt 30 5x, 0,5 % de SDS et 100 μ g/ml d'ADN de spermatozoïdes de saumon cisaillé, dénaturé, et ont été lavés dans SSC 0,1x/0,1 % de SDS, à 65°C.

On a excisé des clones positifs *in vivo* dans pBK-CMV, en utilisant le système ExAssist/XLOLR (Stratagene).

EXAMPLE 7

Clones et analyse des nucléotides

On a isolé des clones d'ADNc, 26.2 et 25.1, à partir de la banque d'ADNc, et on a isolé le clone 1.18 à 5 partir de la banque d'ADNc de GRD de > 2 kb. Par analyse de la séquence, 26.2 est apparu comme étant un ADNc complet codant pour un nouveau canal sodique, et 25.1 s'étendait du domaine II à la 3'-UTR. Toutefois, chacun comportait une délétion qui tronquait la région codante. Le 10 clone 1.18 comportait la région non traduite en 3', en plus de l'extrémité C-terminale de la séquence d'amino-acides déduite de PN5. Le produit de construction dans le vecteur d'expression pBSTACIIR consistait en séquences provenant de 26.2 et 1.18.

15 On a obtenu l'homologie de PN5 avec les autres canaux-sodiques connus en utilisant le programme GAP/Best Fit (GCG) :

	Canal	% de similarité	% d'identité
	PN3a	71	54
20	hPN3	71	55
	PN4	71	53
	PN4a	71	53
	PN1	72	55
	Type I de cerveau de rat	72	55
25	Type II de cerveau de rat	71	54
	Type III de cerveau de rat	71	54
	Canal cardiaque de rat	73	56
	Canal de muscle squelet-		
	tique de rat	71	53

30 Stabilisation de l'ADN complet de PN5

A. Milieux, lignées cellulaires de *E. coli* et conditions de culture

La culture de fragments de PN5 a pu être réalisée dans des conditions classiques, mais la culture de plasmides contenant des produits de construction complets de 35

PN5 (dans pCInéo, pBSTAcIIr et d'autres vecteurs) ne pouvait pas être effectuée sans utilisation de milieux de culture spéciaux, de conditions particulières et de souches spéciales de *E. coli*. Les conditions suivantes se 5 sont révélées être optimales: (1) utilisation de *E. coli* STBL2™ pour la transformation primaire après des réactions de ligature et pour une culture à grande échelle; (2) le milieu solide était FM 0,5x (voir ci-dessous) + LB 1x (1 % de tryptone, 0,5 % d'extrait de levure, 0,5 % de NaCl) + 10 15 g/l de gélose, ou FM 1x + LB 0,5x; (3) le milieu liquide était de façon optimale FM 1x + LB 0,5x; (4) on a utilisé 100 µg/ml de carbénicilline pour tous les milieux, étant donné qu'elle était moins rapidement métabolisée que l'ampicilline; (5) la température pour la croissance ne 15 devait pas être supérieure à 30°C, normalement de 24-26°C; cela demandait de plus longues durées de culture que celles normalement utilisées, allant de 24 à 72 heures.

Milieu de congélation 2x (FM 2x):

20	K ₂ HPO ₄	12,6 g
	Citrate trisodique	0,9 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,18 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,8 g
	KH ₂ PO ₄	3,6 g
	Glycérol	88 g
25	H ₂ O	complément à 1 l

FM 2x et les composants restants du milieu sont préparés séparément, stérilisés par passage à l'autoclave, refroidis jusqu'à au moins 60°C, et ajoutés ensemble pour la formation du milieu final. La carbénicilline est préparée 30 à raison de 25 mg/ml de H₂O et stérilisée par filtration. FM 2x a été décrit en premier lieu pour la préparation de suspensions de base congelées de cellules bactériennes [Practical Methods in Molecular Biology, Schleif R.F. et Wensing P.C., Springer-Verlag, New York (1981), p. 201-35 202].

B. Vecteurs d'expression

Afin d'obtenir une stabilité accrue de l'ADNc complet, on a modifié le vecteur d'expression pBSTAcIIr d'ovocytes pour réduire le nombre de copies de plasmides

5 lors de la culture dans *E. coli* et pour réduire la poursuite de la transcription à partir de séquences du vecteur, qui pourrait conduire à une expression cryptique toxique de la protéine PNS [Brosius J., *Gene* 27, 151-160 (1984)]. On a fait digérer pBSTAcIIr par *Pvu*II. Le fragment de 755 pb, contenant le promoteur de T7, la 5'-UTR de β -globine, le site de clonage multiple, la 3'-UTR de β -globine et le promoteur de T3, a été ligaturé avec le fragment de 3,6 kb contenant l'origine de réPLICATION, le gène de résistance à l'ampicilline, les terminateurs de 10 transcription *rrnBT*₁ et *rrnBT*₁*T*₂ de pKK232-8, qui avait été digéré complètement par *Sma*I et digéré partiellement par *Pvu*II et traité par de la phosphatase intestinale de crevette pour empêcher l'autoligature. Le plasmide résultant, dans lequel l'orientation du fragment pBSTA était 15 telle que le promoteur de T7 était le plus rapproché du terminateur *rrnBT*₁, a été identifié par cartographie de restriction, est dénommé pHQ8. Comme dans le cas de pBSTA, le sens de la transcription du gène de résistance à l'ampicilline et de l'origine de réPLICATION de pHQ8 est 20 opposé à celui de la cassette d'expression du gène, et la présence du terminateur *rrnBT*₁ devrait réduire toute poursuite de lecture restante à partir du vecteur, dans la cassette d'expression conduite par le promoteur de T7.

C. Assemblage d'ADNc complet pour l'expression

30 Etant donné que pBK-CMV.26.2 comporte une délétion de 58 pb (correspondant aux pb 4346 à 4403 de SEQ ID n° 1) et que la séquence de pBK-CMV.1.18 commence au niveau de la pb 4180 de SEQ ID n° 1, pBK-CMV.1.18 pouvait être utilisé pour "réparer" pBK-CMV.26.2. On a mis au point une 35 stratégie pour assembler un ADNc complet provenant des

clones pBK-CMV.26.2 et pBK-CMV.1.18 en trois segments, en tronquant la 5'-UTR et la 3'-UTR et en introduisant des sites de restriction uniques aux extrémités 5' et 3' dans le processus. L'extrémité 5' a été engendrée par PCR à 5 partir de 26.2, en tronquant la 5'-UTR, par incorporation d'un site *SalI* juste en amont du codon d'initiation. Le segment central était un fragment de restriction provenant de 26.2. L'extrémité 3' a été préparée par PCR de chevauchement à partir de 26.2 et 1.18, et incorporation d'un 10 site *XbaI* juste en aval du codon d'arrêt. On a fait digérer ces segments au niveau de sites uniques de restriction, et on les a assemblés dans pBSTAcIIr. Ce produit de construction semblait avoir une séquence correcte, mais, après reclonage en tant que fragment *SalI-XbaI* dans 15 pCInéo, on a trouvé deux types d'isolats, un comportant une délétion et un comportant une insertion de 8 pb. Un nouvel examen du clone pBSTAcIIr a montré que la séquence était "mixte" dans cette région, de sorte que le clone devait avoir été réarrangé. On a découvert que l'insertion 20 de 8 pb était une répétition de l'un des membres d'une duplication de 8 pb dans la séquence native, formant une triple répétition de 8 pb dans l'isolat réarrangé. De nombreuses tentatives de clonage ont inévitablement donné naissance à ce réarrangement. On a utilisé la PCR de chevauchement pour introduire des mutations silencieuses dans 25 l'une des répétitions de 8 pb, et un fragment contenant cette région a été inclus lorsque la région codant pour PNS a été assemblée dans HQ8, la version à faible nombre de copies de pBSTAcIIr, pour donner le plasmide HR-1.

30 Cette séquence s'est avérée être stable (voir figures 5A-E, SEQ ID n° 5).

On a préparé le fragment de l'extrémité 5' par PCR, en utilisant comme matrice l'ADN de pBK-CMV.26.2 et les amorces 4999 (CTTGGTCGACTCTAGATCAGGGTGAAGATGGAGGAG; site 35 *SalI* souligné, homologie avec PNS en italiques, correspon-

dant aux pb 58-77 de SEQ ID n° 1; codon d'initiation en gras) et 4927 (GTCTTCTAGATGAGGGTTCAGTCATTGTG, correspondant aux pb 1067 à 1047 de SEQ ID N°1), suivie de purification en gel, digestion par *SalI* et *KpnI* (site *KpnI* au niveau des
5 pb 1003-1008, SEQ ID n° 1) et purification en gel.

Le fragment central de 3,1 kb a été préparé par digestion de l'ADN de pBK-CMV.26.2 par *KpnI* et *AatII* (site *AatII* à 4133-4138), suivie d'une purification en gel.

Le fragment de l'extrémité 3' a été préparé comme
10 suit: la PCR à l'aide des amorce 4837 (TCTGGGAAGTTGGAAAG, correspondant aux pb 3613 à 3629 de SEQ ID n° 1) et 4931 (GACCACGAAGGCTATGTTGAGG, correspondant aux pb 4239 à 4218 de SEQ ID n° 1) sur l'ADN de pBK-CMV.26.2 en tant que matrice a donné un fragment de 0,6 kb. La PCR, à l'aide
15 des amorce 4930 (CCTAACATAGCCTCGTGGTC, correspondant aux pb 4218 à 4239 de SEQ ID n° 1) et 4929 (GTCTTCTAGATGAGGGTTCAGTCATTGTG, site *XbaI* souligné, homologie avec PNR en italiques, correspondant aux pb 5386 à 5365 de SEQ ID n° 1, codon d'arrêt en gras) sur l'ADN de
20 pBK-CMV.1.18 en tant que matrice, a donné un fragment de 1,2 kb, introduisant un site *XbaI* à 7 pb du codon d'arrêt. L'extrémité 3' du fragment 4837-4931 complète donc exactement l'extrémité 5' du fragment 4930-4929. Ces deux fragments ont été purifiés en gel, et une fraction de chaque a
25 été réunie en tant que matrice dans une réaction PCR, à l'aide des amorce 4928 (CAAGCCTTGTTGAC, correspondant aux pb 4084 à 4101 de SEQ ID n° 1) et 4929, pour donner un fragment de 1,3 kb. Ce fragment a été purifié en gel, digéré par *AatII* et *XbaI*, et le fragment de 1,2 kb a été
30 purifié en gel.

Le fragment de l'extrémité 3' a été cloné dans pBSTAcIIr digéré par *AatII* et *XbaI*. Un isolat a été digéré par *SalI* et *KpnI* et ligaturé avec le fragment de l'extrémité 5'. Le plasmide résultant, après vérification de la
35 séquence, a été digéré par *KpnI* et *AatII* et ligaturé avec

le fragment central de 3,1 kb, pour donner pBSTAcIIr.PNS (clone 21). pBSTAcIIr.PNS (clone 21) a été digérée par *SalI* et *XbaI*, pour libérer le fragment PNS de 5,3 kb, qui a été cloné dans pCInéoII digéré par *SalI* et *XbaI*. On a trouvé 5 de multiples isolats, dont GPII-1, qui a été séquencé complètement, était caractéristique et contenait un insert de 8 pb. Cet insert CAGAAGAA, après la pb 3994 de SEQ ID n° 1, convertissait la répétition directe de cette séquence en cet emplacement en une triple répétition 10 directe, provoquant un déplacement dans le cadre de lecture. Dans une tentative pour réparer ce défaut, on a fait digérer pBSTAcIIr.PNS (clone 21) par *NheI* (pb 2538-2543, SEQ ID n° 1) et *XhoI* (pb 4828-4833, SEQ ID n° 1), pour obtenir un fragment de 6,2 kb, et avec *AatII* et *XhoI*, pour 15 obtenir un fragment de 0,7 kb qui a été ligaturé avec le fragment de 1,6 kb résultant de la digestion de pBK-CMV.26.2 par *AatII* et *NheI*. Bien qu'on n'ait trouvé aucun isolat totalement correct, un isolat, HA-4, comportait seulement un seul changement de base, une délétion de 20 la C à la pb 4827 (SEQ ID n° 1), adjacente au site *XhoI*.

Afin d'éviter que se produise le réarrangement par insertion de 8 pb, on a introduit trois mutations silencieuses dans la répétition en 5', et deux mutations supplémentaires dans une série de T seraient également introduites, comme indiqué ci-dessous (pb 3982 à 4014, SEQ ID n° 1; sites de mutation soulignés, répétitions de 8 pb dans la séquence native en italiques) :

séquence native GAC ATT TTT ATG ACA GAA GAA CAG AAG AAA TAT
 Asp Ile Phe Met Thr Glu Glu Gln Lys Lys Tyr
 30 séquence mutante GAC ATC TTC ATG ACT GAG GAG CAG AAG AAA TAT

Etant donné que l'isolat HA-4 comportait la séquence répétée directe native [par opposition à, par exemple, pBSTAcIIr.PNS (clone 21)] et que la région voisine du défaut du site *XhoI* n'était pas impliquée, on l'a 35 utilisé comme ADN matrice pour les réactions PCR sui-

vantes. L'amorce P5-3716S

(CCGAAGCCAATGTAACATTAGTAATTACTCGTG, correspondant aux pb
3684 à 3716, SEQ ID n° 1) a été appariée avec l'amorce
P5-3969AS (GCTCCTCAGTCATGAAGATGTCTGGCCACCTAAC, correspon-
5 dant aux pb 4003 à 3969, SEQ ID n° 1, les bases mutées
sont soulignées), pour donner un produit de 320 pb.

L'amorce P5-4017S

(GGCCAAGACATCTTCATGACTGAGGAGCAGAAGAAATATTAC, correspondant
aux pb 3976 à 4017, SEQ ID n° 1; les bases mutées sont
10 soulignées) a été appariée avec l'amorce P5-4247AS
(CTCAAAGCAAAGACTTTGATGAGACACTCTATGG, correspondant aux pb
4280 à 4247, SEQ ID n° 1), pour donner un produit de
305 pb. L'extrémité 3' du fragment de 320 pb avait donc un
segment de 28 pb correspondant exactement à l'extrémité 5'
15 du fragment de 305 pb. Les deux bandes ont été purifiées
en gel, et une fraction de chaque a été réunie, dans une
nouvelle réaction PCR, avec les amorces P5-3716S et
P5-4247AS, pour donner un produit de 597 pb, qui a été
cloné T/A dans le vecteur pCRII. On a trouvé l'isolat
20 HO-7, qui avait la séquence recherchée. On a effectué une
quadruple ligature pour assembler le PN5 modifié complet:

On a fait digérer par *Sal*I et *Xba*I le vecteur d'expression HQ-8 dans des ovocytes, pour obtenir un fragment vecteur de 4,4 kb, G_{II}-1; on a fait digérer G_{II}-1 par
25 *Sal*I et *Mlu*I, pour obtenir un fragment de 3,8 kb contenant la moitié 5' de PN5; on a fait digérer HO-7 par *Mlu*I (pb 3866 à 3871, SEQ ID n° 1) et *Aat*II, pour obtenir un fragment de 0,3 kb contenant la région répétée de 8 pb mutante de PN5; on a fait digérer G_{II}-1 par *Aat*II et *Xba*I, pour
30 obtenir le segment 3' restant de 1,3 kb de PN5. Une partie du mélange réactionnel de ligature a été transformé dans des cellules Stable 2 de *E. coli*. Parmi les isolats de 9,6 kb contenant tous les quatre fragments, HR-1 a été séquencé et s'est révélé comporter la séquence de 5,4 kb
35 recherchée. Ces isolats se développaient bien et ne mani-

festaiient pas de tendance au réarrangement. La séquence de cette version construite de PN5 est représentée sur les figures 5A-E (SEQ ID n° 5).

EXAMPLE 8

5 PNR humain

On a isolé un clone de 856 pb (figure 3A, SEQ ID n° 3) à partir d'une banque d'ADNc de ganglions de la racine dorsale (GRD) humains, qui est très étroitement apparenté à PN5 de rat, avec une identité de 79 % en ce qui concerne la séquence d'aminoacides. La séquence de PN5 humain couvre la région entre IIIS1 et l'interdomaine III/IV, qui comprend la vanne d'inactivation rapide (à savoir IFM), qui est localisée dans l'interdomaine III/IV.

On a construit la banque d'ADNc de GRD à partir d'ARN total de GRD 4 et 5 lombaires qui était amorcé au hasard. L'ADNc du premier brin a été synthétisé à l'aide de transcriptase inverse SuperScript II (GIBCO BRL), et la synthèse du second brin a été effectuée à l'aide d'ADN polymérase de T4. Des segments de raccord EcoRI ont été ligaturés avec les extrémités des ADNc double brin, et les fragments ont été clonés dans le vecteur ZAP II (Stratagene). La banque a été criblée à l'aide de PN3 de rat marqué à la digoxigénine, PN1 de rat et des sondes hH1 de cœur humain. Les clones positifs ont été séquencés et comparés à des séquences connues de canaux sodiques humains et de rat. Seul le clone précité a été identifié en tant que séquence de PN5 humain.

	Canal	% de similarité	% d'identité
	Cerveau humain (HBA)	76	69
30	Coeur humain (hH1)	81	74
	Coeur atypique humain	60	52
	Muscle squelettique humain	80	71
	Neuroendocrine humaine	78	71
	PN3 humain	77	70
35	PN1 de rat	79	72

Canal	% de similarité	% d'identité
PN3 de rat	78	71
PN4 de rat	78	70
PN5 de rat	86	79

5 La figure 3B compare la séquence d'aminoacides du fragment hPN5 avec la séquence d'aminoacides de PN5 de rat, dans la région appropriée.

EXAMPLE 9

Distribution tissulaire par RT-PCR

10 On a isolé à partir de rats Sprague-Dawley mâles adultes normaux, anesthésiés, des tissus de cerveau, de moelle épinière, de GRD, de ganglions plexiformes, de ganglions cervicaux supérieurs, de nerf sciatique, de cœur et de muscle squelettique, et on les a conservés à -80°C.

15 15 On a isolé l'ARN de chaque tissu à l'aide de RNazol (Tel-Test Inc.). L'ADNc amorcé au hasard a été transcrit par transcription inverse à partir de 500 mg d'ARN provenant de chaque tissu. L'amorce directe

20 (CAGATTGTGTTCTCAGTACATTCC) et l'amorce inverse (CCAGGTGTCTAACGAATAAATAGG) ont été conçues à partir de la région non traduite en 3', pour donner un fragment de 252 paires de bases. Les paramètres de cycle étaient 94°C/2 minutes (dénaturation), 94°C/30 s, 65°C/30 s et 72°C/1 min (35 cycles) et 72°C/4 min. Les produits de 25 réaction ont été analysés sur un gel d'agarose à 4 %.

30 Un témoin positif et un témoin sans matrice ont été également inclus. On a également amplifié par PCR de l'ADNc provenant de chaque tissu, en utilisant des amorces spécifiques de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, pour montrer la viabilité de la matrice, comme décrit par Tso et coll., Nucleic Acid Res. 13, 2485-2502 (1985).

Le profil de distribution tissulaire de rPN5 par analyse par RT-PCR d'ARN provenant de tissus choisis de rat, était le suivant:

- 40 -

	<u>Tissu</u>	<u>RT-PCR (35 cycles)</u>
	Cerveau	+
	Moelle épinière	+
	GRD	+++
5	Ganglions plexiformes	+++
	Ganglions cervicaux supérieurs	+
	Nerf sciatique	-
	Coeur	-
	Muscle squelettique	-
10	F11 non traité	+
	F11 traité	+
	PNS a été également détecté après seulement 25 cycles (24 + 1) dans les mêmes cinq tissus que ci- dessus, en la même abondance relative.	
15	EXEMPLE 10	

Anticorps

Un peptide synthétique (26 aminoacides dans les interdomaines II et III - résidus 977 à 1002) a été conjugué avec KLH et l'anticorps a été suscité chez des lapins.

20 L'antisérum a été ensuite purifié par affinité. PNS constitue une sous-famille de nouveaux gènes de canaux sodiques; ces gènes sont différents de ceux détectables avec d'autres sondes (par exemple les sondes PEAF8 et PN3).

25 Il doit être bien entendu que la description qui précède n'a été donnée qu'à titre illustratif et non limitatif et que toutes variantes ou modifications peuvent y être apportées sans sortir pour autant du cadre général de présente invention, tel que défini dans les revendications 30 ci-annexées.

- 41 -

LISTE DES SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(I) DEMANDERESSE:

(A) NOM: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

5 (B) RUE: Grenzacherstrasse 124

(C) VILLE: Bâle

(D) ETAT: BS

(E) PAYS: Suisse

(F) CODE POSTAL: CH-4010

10 (G) TELEPHONE: 061-6884256

(H) TELECOPIEUR: 061-6881395

(I) TELEX: 962292/965542 hlr ch

(II) TITRE DE L'INVENTION: Séquence d'ADN codant pour
une protéine de canal sodique, sa production et
15 son utilisation

(III) NOMBRE DES SEQUENCES: 5

(IV) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: disque souple

(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

20 (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

(D) LOGICIEL: PatentIn Release n° 1.0, version
1.30

(2) INFORMATIONS POUR SEQ ID n° 1:

(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

25 (A) LONGUEUR: 5 908 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) TYPE DE BRIN: simple

(D) TOPOLOGIE: linéaire

(II) TYPE DE MOLECULE: ADNc

30 (III) HYPOTHETIQUE: non

(IV) ANTISENS: non

(VI) SOURCE D'ORIGINE:

(A) ORGANISME: rat

35 (B) TYPE DE TISSU: ganglions de la racine dor-
sale

(C) TYPE DE CELLULE: nerf périphérique

(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID n° 1:

1 GAAGTCACAG GAGTGTCTGT CAGCGAGAGG AAGAAGGGAG AGTTTACTGA
 5 51 GTGTCTTCTG CCCCTCCTCA GGGTGAAGAT GGAGGAGAGG TACTACCCGG
 101 TGATCTTCCC GGACGAGCGG AATTTCGCC CCTTCACCTTC CGACTCTCTG
 151 GCTGCCATAG AGAACGCGGAT TGCTATCCAA AAGGAGAGGA AGAACGCAA
 201 AGACAAGGCG GCAGCTGAGC CCCAGCCTCG GCCTCAGCTT GACCTAAAGG
 10 251 CCTCCAGGAA GTTACCTAAG CTTTATGGTG ACATTCCCC TGAGCTTGTGTA
 301 GCGAACGCTC TCGAAGACCT GGACCCATTAC TACAAAGACC ATAAGACATT
 351 CATGGTGTG AACAAAGAAGA GAACAATTAA TCGCTTCAGC GCCAAGCGGG
 401 CCTTGTTCAT TCTGGGCCT TTTAATCCCC TCAGAAGCTT AATGATTGTT
 15 451 ATCTCTGTCC ATTCACTGCTT TAGCATGTTC ATCATCTGCA CGGTGATCAT
 501 CAACTGTATG TTCATGGCGA ATTCTATGGA GAGAAGTTTC GACAACGACA
 551 TTCCCGAATA CGTCTTCATT GGGATTATA TTTTAGAAGC TGTGATTAAA
 20 601 ATATTGGCAA GAGGCTTCAT TGTGGATGAG TTTTCCTTCC TCCGAGATCC
 651 GTGGAACCTGG CTGGACTTCA TTGTCATTGG AACAGCGATC GCAACTTGTGTT
 701 TTCCGGCAG CCAAGTCAAT CTTTCAGCTC TTCTGACCTT CCGAGTGTTC
 751 AGAGCTCTGA AGGCGATTTC AGTTATCTCA GGTCTGAAGG TCATCGTAGG
 25 801 TGCCCTGCTG CGCTCGGTGA AGAACGCTGGT AGACGTGATG GTCCTCACTC
 851 TCTTCTGCCT CAGCATCTT GCCCTGGTCG GTCAGCAGCT GTTCATGGGA
 901 ATTCTGAACC AGAACGTTAT TAAGCACAAC TGTGGCCCCA ACCCTGCATC
 951 CAACAAGGAT TGCTTTGAAA AGGAAAAAGA TAGCGAAGAC TTCATAATGT
 30 1001 GTGGTACCTG GCTCGGCAGC AGACCCCTGTC CCAATGGTTC TACGTGCGAT
 1051 AAAACACAT TGAACCCAGA CAATAATTAT ACAAAAGTTG ACAACTTTGG
 1101 CTGGTCCTT CTCGCCATGT TCCGGGTTAT GACTCAAGAC TCCTGGGAGA
 1151 GGCTTACCG ACAGATCCTG CGGACCTCTG GGATCTACTT TGTCTTCTTC

1201 TTCTGGTGG TCATCTCCT GGGCTCCTTC TACCTGCTTA ACCTAACCCCT
 1251 GGCTGTTGTC ACCATGGCTT ATGAAGAACAA GAACAGAAAT GTAGCTGCTG
 1301 AGACAGAGGC CAAGGAGAAA ATGTTTCAGG AAGCCCAGCA GCTGTTAAGG
 5 1351 GAGGAGAAGG AGGCTCTGGT TGCCATGGGA ATTGACAGAA GTTCCCTTAA
 1401 TTCCCTTCAA GCTTCATCCT TTTCCCCGAA GAAGAGGAAG TTTTCGGTA
 1451 GTAAGACAAG AAAGTCCTTC TTTATGAGAG GGTCCAAGAC GGCCCAAGCC
 1501 TCAGCGTCTG ATTCAAGAGGA CGATGCCTCT AAAAATCCAC AGCTCCTTGA
 10 1551 GCAGACCAAA CGACTGTCCC AGAACTTGCC AGTGGATCTC TTTGATGAGC
 1601 ACGTGGACCC CCTCCACAGG CAGAGAGCGC TGAGCGCTGT CAGTATCTTA
 1651 ACCATCACCA TGCAAGAACAA AGAAAAATTG CAGGAGCCTT GTTTCCCATG
 15 1701 TGGGAAAAAT TTGGCCTCTA AGTACCTGGT GTGGGACTGT AGCCCTCAGT
 1751 GGCTGTGCAT AAAGAAGGTC CTGCGGACCA TCATGACGGA TCCCTTTACT
 1801 GAGCTGGCCA TCACCACATCTG CATCATCATC AATACCGTTT TCTTAGCCGT
 1851 GGAGCACCAC AACATGGATG ACAACTTAA GACCATACTG AAAATAGGAA
 20 1901 ACTGGGTTTT CACGGGAATT TTCATAGCGG AAATGTGTCT CAAGATCATC
 1951 GCGCTCGACC CTTACCACTA CTTCCGGCAC GGCTGGAATG TTTTGACAG
 2001 CATCGTGGCC CTCCTGAGTC TCGCTGATGT GCTCTACAAC ACACTGTCTG
 2051 ATAACAATAG GTCTTTCTTG GCTTCCCTCA GAGTGCTGAG GGTCTTCAAG
 25 2101 TTAGCCAAAT CCTGGCCCAC GTTAAACACT CTCATTAAGA TCATCGGCCA
 2151 CTCCGTGGGC GCGCTTGGAA ACCTGACTGT GGTCCCTGACT ATCGTGGTCT
 2201 TCATCTTTTC TGTGGTGGGC ATGCGGCTCT TCGGCACCAA GTTTAACAAAG
 2251 ACCGCCTACG CCACCCAGGA GCGGGCCAGG CGGGCGCTGGC ACATGGATAA
 30 2301 TTTCTACCAAC TCCTTCCTGG TGGTGTCCG CATCCTCTGT GGGAAATGGA
 2351 TCGAGAACAT GTGGGGCTGC ATGCAGGATA TGGACGGCTC CCCGTTGTGC
 2401 ATCATTGTCT TTGTCCTGAT AATGGTGATC GGGAAAGCTTG TGGTGCTTAA
 35 2451 CCTCTTCATT GCCTTGCTGC TCAATTCCCTT CAGCAATGAG GAGAAGGATG

2501 GGAGCCTGGA AGGAGAGACC AGGAAAACCA AAGTGCAGCT AGCCCTGGAT
 2551 CGGTTCCGCC GGGCCTTCTC CTTCATGCTG CACGCTCTTC AGAGTTTTG
 2601 TTGCAAGAAA TGCAGGAGGA AAAACTCGCC AAAGCCAAAA GAGACAACAG
 5 2651 AAAGCTTTGC TGGTGAGAAT AAAGACTCAA TCCTCCCGGA TGCGAGGCC
 2701 TGGAAAGGAGT ATGATACAGA CATGGCTTTG TACACTGGAC AGGCCGGGGC
 2751 TCCGCTGGCC CCACTCGCAG AGGTAGAGGA CGATGTGGAA TATTGTGGTG
 2801 AAGGCGGTGC CCTACCCACC TCACAACATA GTGCTGGAGT TCAGGCCGGT
 10 2851 GACCTCCCTC CAGAGACCAA GCAGCTCACT AGCCCGGATG ACCAAGGGGT
 2901 TGAAATGGAA GTATTTCTG AAGAAGATCT GCATTTAACG ATACAGAGTC
 2951 CTCGAAAGAA GTCTGACGCA GTGAGCATGC TCTCGGAATG CAGCACAAATT
 15 3001 GACCTGAATG ATATCTTAG AAATTTACAG AAAACAGTTT CCCCCAAAAAA
 3051 GCAGCCAGAT AGATGCTTTC CCAAGGGCCT TAGTTGTCAC TTTCTATGCC
 3101 ACAAAACAGA CAAGAGAAAG TCCCCCTGGG TCCTGTGGTG GAACATTGG
 3151 AAAACCTGCT ACCAAATCGT GAAGCACAGC TGGTTTGAGA GTTTCATAAT
 20 3201 CTTTGTATT CTGCTGAGCA GTGGAGCGCT GATATTTGAA GATGTCAATC
 3251 TCCCCAGCCG GCCCCAAGTT GAGAAATTAC TAAGGTGTAC CGATAATATT
 3301 TTCACATTAA TTTTCTCCT GGAAATGATC CTGAAGTGGG TGGCCTTTGG
 3351 ATTCCGGAGG TATTTCACCA GTGCCTGGTG CTGGCTTGAT TTCCTCATTG
 25 3401 TGGTGGTGTC TGTGCTCACT CTCATGAATC TACCAAGCTT GAAGTCCTTC
 3451 CGGACTCTGC GGGCCCTGAG ACCTCTGCGG GCGCTGTCCC AGTTTGAAGG
 3501 AATGAAGGTT GTCGTCTACG CCCTGATCAG CGCCATACCT GCCATTCTCA
 3551 ATGTCTTGCT GGTCTGCCTC ATTTCTGGC TCGTATTTG TATCTTGGGA
 30 3601 GTAAATTAT TTTCTGGAA GTTTGGAAGG TGCATTAACG GGACAGACAT
 3651 AAAATATGTAT TTGGATTTA CCGAAGTTCC GAACCGAAGC CAATGTAACA
 3701 TTAGTAATTA CTCGTGGAAG GTCCCGCAGG TCAACTTTGA CAACGTGGGG
 35 3751 AATGCCTATC TCGCCCTGCT GCAAGTGGCA ACCTATAAGG GCTGGCTGGGA

3801 AATCATGAAT GCTGCTGTCG ATTCCAGAGA GAAAGACGAG CAGCCGGACT
3851 TTGAGGCAGA CCTCTACGCG TATCTCTACT TTGTGGTTTT TATCATCTTC
3901 GGCTCCTTCT TTACCCCTGAA CCTCTTTATC GGTGTTATTAA TTGACAACCT
5 3951 CAATCAGCAG CAGAAAAAGT TAGGTGGCCA AGACATTTTT ATGACAGAAG
4001 AACAGAAGAA ATATTACAAT GCAATGAAAA AGTTAGGAAC CAAGAAACCT
4051 CAAAAGCCC A TCCCAAGGCC CCTGAACAAA TGTCAGGCCT TTGTGTTCGA
4101 CCTGGTCACA AGCCAGGTCT TTGACGTCAT CATTCTGGGT CTTATTGTCT
10 4151 TAAATATGAT TATCATGATG GCTGAATCTG CCGACCAGCC CAAAGATGTG
4201 AAGAAAACCT TTGATATCCT CAACATAGCC TTCGTGGTCA TCTTTACCAT
4251 AGAGTGTCTC ATCAAAGTCT TTGCTTGAG GCAACACTAC TTCACCAATG
15 4301 GCTGGAACCT ATTTGATTGT GTGGTCGTGG TTCTTTCTAT CATTAGTACC
4351 CTGGTTTCCC GCTTGGAGGA CAGTGACATT TCTTCCC CGCCACGCTCTT
4401 CAGAGTCGTC CGCTTGGCTC GGATTGGTCG AATCCTCAGG CTGGTCCGGG
4451 CTGCCCGGGG AATCAGGACC CTCCTCTTG CTTTGATGAT GTCTCTCCCC
20 4501 TCTCTCTTCA ACATCGGTCT GCTGCTCTTC CTGGTGATGT TCATTACGC
4551 CATCTTGGG ATGAGCTGGT TTTCAAAGT GAAGAAGGGC TCCGGGATCG
4601 ACGACATCTT CAACTTCGAG ACCTTACGG GCAGCATGCT GTGCCTCTTC
4651 CAGATAACCA CTTGGCTGG CTGGGATAACC CTCCTCAACC CCATGCTGGA
25 4701 GGCAAAAGAA CACTGCAACT CCTCCTCCCA AGACAGCTGT CAGCAGCCGC
4751 AGATAGCCGT CGTCTACTTC GTCAGTTACA TCATCATCTC CTTCCCTCATC
4801 GTGGTCAACA TGTACATCGC TGTGATCCTC GAGAACTTCA ACACAGCCAC
4851 GGAGGGAGAGC GAGGACCCCTC TGGGAGAGGA CGACTTTGAA ATCTTCTATG
30 4901 AGGTCTGGGA GAAGTTGAC CCCGAGGCCT CGCAGTTCAT CCAGTATTG
4951 GCCCTCTCTG ACTTTGCGGA CGCCCTGCCG GAGCCGTTGC GTGTGGCCAA
5001 GCCGAATAAG TTTCAGTTTC TAGTGATGGA CTTGCCCATG GTGATGGCG
35 5051 ACCGCCCTCCA TTGCATGGAT GTTCTCTTG CTTCACTAC CAGGGTCCTC

- 46 -

5101 GGGGACTCCA CGGGCTTGGGA TACCATGAAA ACCATGATGG AGGAGAAGTT
 5151 TATGGAGGCC AACCCTTTA AGAACGCTCTA CGAGCCCATA GTCACCACCA
 5201 CCAAGAGGAA GGAGGAGGAG CAAGGCGCCG CCGTCATCCA GAGGGCCTAC
 5 5251 CGGAAACACA TGGAGAAGAT GGTCAAAC TG AGGCTGAAGG ACAGGTCAAG
 5301 TTCATCGCAC CAGGTGTTT GCAATGGAGA CTTGTCCAGC TTGGATGTGG
 5351 CCAAGGTCAA GGTTCACAAAT GACTGAACCC TCATCTCCAC CCCTACCTCA
 5401 CTGCCTCACA GCTTAGCCTC CAGCCTCTGG CGAGCAGGCG GCAGACTCAC
 10 5451 TGAACACAGG CCGTTCGATC TGTGTTTTG GCTGAACGAG GTGACAGGTT
 5501 GGCgtCCATT TTTAAATGAC TCTTGGAAAG ATTTCATGTA GAGAGATGTT
 5551 AGAAGGGACT GCAAAGGACA CCGACCATAA CGGAAGGCCT GGAGGACAGT
 5601 CCAACTTACA TAAAGATGAG AAACAAGAAG GAAAGATCCC AGGAAAACCTT
 15 5651 CAGATTGTGT TCTCAGTACA TCCCCCAATG TGTCTGTTCG GTGTTTGAG
 5701 TATGTGACCT GCCACATGTA GCTCTTTTT GCATGTACGT CAAAACCTG
 5751 CAGTAAGTTG ATAGCTTGCT ACGGGTGTTC CTACCAGCAT CACAGAATTG
 20 5801 GGTGTATGAC TCAAACCTAA AAGCATGACT CTGACTTGTC AGTCAGCACC
 5851 CCGACTTTCA GACGCTCCAA TCTCTGTCCC AGGTGTCTAA CGAATAAAATA
 5901 GGTAAAAG

(3) INFORMATIONS POUR SEQ ID n° 2:

- (I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - 25 (A) LONGUEUR: 1 765 aminoacides
 - (B) TYPE: aminoacide
 - (C) TYPE DE BRIN: -
 - (D) TOPOLOGIE: sans rapport
- (II) TYPE DE MOLECULE: protéine
- 30 (III) HYPOTHETIQUE: oui
- (VI) SOURCE D'ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: rat
 - (B) TYPE DE TISSU: ganglions de la racine dorsale
- 35 (C) TYPE DE CELLULE: nerf périphérique

- 48 -

Met Gly Ile Leu Asn Gln Lys Cys Ile Lys His Asn Cys Gly Pro Asn
 275 280 285
 Pro Ala Ser Asn Lys Asp Cys Phe Glu Lys Glu Lys Asp Ser Glu Asp
 290 295 300
 5 Phe Ile Met Cys Gly Thr Trp Leu Gly Ser Arg Pro Cys Pro Asn Gly
 305 310 315 320
 Ser Thr Cys Asp Lys Thr Thr Leu Asn Pro Asp Asn Asn Tyr Thr Lys
 325 330 335
 Phe Asp Asn Phe Gly Trp Ser Phe Leu Ala Met Phe Arg Val Met Thr
 10 340 345 350
 Gln Asp Ser Trp Glu Arg Leu Tyr Arg Gln Ile Leu Arg Thr Ser Gly
 355 360 365
 Ile Tyr Phe Val Phe Phe Val Val Val Ile Phe Leu Gly Ser Phe
 370 375 380
 15 Tyr Leu Leu Asn Leu Thr Leu Ala Val Val Thr Met Ala Tyr Glu Glu
 385 390 395 400
 Gln Asn Arg Asn Val Ala Ala Glu Thr Glu Ala Lys Glu Lys Met Phe
 405 410 415
 Gln Glu Ala Gln Gln Leu Leu Arg Glu Glu Lys Glu Ala Leu Val Ala
 20 420 425 430
 Met Gly Ile Asp Arg Ser Ser Leu Asn Ser Leu Gln Ala Ser Ser Phe
 435 440 445
 Ser Pro Lys Lys Arg Lys Phe Phe Gly Ser Lys Thr Arg Lys Ser Phe
 450 455 460
 25 Phe Met Arg Gly Ser Lys Thr Ala Gln Ala Ser Ala Ser Asp Ser Glu
 465 470 475 480
 Asp Asp Ala Ser Lys Asn Pro Gln Leu Leu Glu Gln Thr Lys Arg Leu
 485 490 495
 Ser Gln Asn Leu Pro Val Asp Leu Phe Asp Glu His Val Asp Pro Leu
 30 500 505 510
 His Arg Gln Arg Ala Leu Ser Ala Val Ser Ile Leu Thr Ile Thr Met
 515 520 525
 Gln Glu Gln Glu Lys Phe Gln Glu Pro Cys Phe Pro Cys Gly Lys Asn
 530 535 540

- 49 -

Leu Ala Ser Lys Tyr Leu Val Trp Asp Cys Ser Pro Gln Trp Leu Cys
 545 550 555 560
 Ile Lys Lys Val Leu Arg Thr Ile Met Thr Asp Pro Phe Thr Glu Leu
 565 570 575
 5 Ala Ile Thr Ile Cys Ile Ile Asn Thr Val Phe Leu Ala Val Glu
 580 585 590
 His His Asn Met Asp Asp Asn Leu Lys Thr Ile Leu Lys Ile Gly Asn
 595 600 605
 Trp Val Phe Thr Gly Ile Phe Ile Ala Glu Met Cys Leu Lys Ile Ile
 10 610 615 620
 Ala Leu Asp Pro Tyr His Tyr Phe Arg His Gly Trp Asn Val Phe Asp
 625 630 635 640
 Ser Ile Val Ala Leu Leu Ser Leu Ala Asp Val Leu Tyr Asn Thr Leu
 645 650 655
 15 Ser Asp Asn Asn Arg Ser Phe Leu Ala Ser Leu Arg Val Leu Arg Val
 660 665 670
 Phe Lys Leu Ala Lys Ser Trp Pro Thr Leu Asn Thr Leu Ile Lys Ile
 675 680 685
 Ile Gly His Ser Val Gly Ala Leu Gly Asn Leu Thr Val Val Leu Thr
 20 690 695 700
 Ile Val Val Phe Ile Phe Ser Val Val Gly Met Arg Leu Phe Gly Thr
 705 710 715 720
 Lys Phe Asn Lys Thr Ala Tyr Ala Thr Gln Glu Arg Pro Arg Arg Arg
 725 730 735
 25 Trp His Met Asp Asn Phe Tyr His Ser Phe Leu Val Val Phe Arg Ile
 740 745 750
 Leu Cys Gly Glu Trp Ile Glu Asn Met Trp Gly Cys Met Gln Asp Met
 755 760 765
 30 Asp Gly Ser Pro Leu Cys Ile Ile Val Phe Val Leu Ile Met Val Ile
 770 775 780
 Gly Lys Leu Val Val Leu Asn Leu Phe Ile Ala Leu Leu Asn Ser
 785 790 795 800
 Phe Ser Asn Glu Glu Lys Asp Gly Ser Leu Glu Gly Glu Thr Arg Lys
 805 810 815
 35

- 50 -

Thr Lys Val Gln Leu Ala Leu Asp Arg Phe Arg Arg Ala Phe Ser Phe
 820 825 830
 Met Leu His Ala Leu Gln Ser Phe Cys Cys Lys Cys Arg Arg Lys
 835 840 845
 5 Asn Ser Pro Lys Pro Lys Glu Thr Thr Glu Ser Phe Ala Gly Glu Asn
 850 855 860
 Lys Asp Ser Ile Leu Pro Asp Ala Arg Pro Trp Lys Glu Tyr Asp Thr
 865 870 875 880
 Asp Met Ala Leu Tyr Thr Gly Gln Ala Gly Ala Pro Leu Ala Pro Leu
 10 885 890 895
 Ala Glu Val Glu Asp Asp Val Glu Tyr Cys Gly Glu Gly Gly Ala Leu
 900 905 910
 Pro Thr Ser Gln His Ser Ala Gly Val Gln Ala Gly Asp Leu Pro Pro
 915 920 925
 15 Glu Thr Lys Gln Leu Thr Ser Pro Asp Asp Gln Gly Val Glu Met Glu
 930 935 940
 Val Phe Ser Glu Glu Asp Leu His Leu Ser Ile Gln Ser Pro Arg Lys
 945 950 955 960
 Lys Ser Asp Ala Val Ser Met Leu Ser Glu Cys Ser Thr Ile Asp Leu
 20 965 970 975
 Asn Asp Ile Phe Arg Asn Leu Gln Lys Thr Val Ser Pro Lys Lys Gln
 980 985 990
 Pro Asp Arg Cys Phe Pro Lys Gly Leu Ser Cys His Phe Leu Cys His
 995 1000 1005
 25 Lys Thr Asp Lys Arg Lys Ser Pro Trp Val Leu Trp Trp Asn Ile Arg
 1010 1015 1020
 Lys Thr Cys Tyr Gln Ile Val Lys His Ser Trp Phe Glu Ser Phe Ile
 1025 1030 1035 1040
 Ile Phe Val Ile Leu Leu Ser Ser Gly Ala Leu Ile Phe Glu Asp Val
 30 1045 1050 1055
 Asn Leu Pro Ser Arg Pro Gln Val Glu Lys Leu Leu Arg Cys Thr Asp
 1060 1065 1070
 Asn Ile Phe Thr Phe Ile Phe Leu Leu Glu Met Ile Leu Lys Trp Val
 1075 1080 1085

- 51 -

Ala Phe Gly Phe Arg Arg Tyr Phe Thr Ser Ala Trp Cys Trp Leu Asp
 1090 1095 1100
 Phe Leu Ile Val Val Val Ser Val Leu Ser Leu Met Asn Leu Pro Ser
 1105 1110 1115 1120
 Leu Lys Ser Phe Arg Thr Leu Arg Ala Leu Arg Pro Leu Arg Ala Leu
 5 1125 1130 1135
 Ser Gln Phe Glu Gly Met Lys Val Val Val Tyr Ala Leu Ile Ser Ala
 1140 1145 1150
 Ile Pro Ala Ile Leu Asn Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Phe Trp Leu
 1155 1160 1165
 10 Val Phe Cys Ile Leu Gly Val Asn Leu Phe Ser Gly Lys Phe Gly Arg
 1170 1175 1180
 Cys Ile Asn Gly Thr Asp Ile Asn Met Tyr Leu Asp Phe Thr Glu Val
 1185 1190 1195 1200
 Pro Asn Arg Ser Gln Cys Asn Ile Ser Asn Tyr Ser Trp Lys Val Pro
 15 1205 1210 1215
 Gln Val Asn Phe Asp Asn Val Gly Asn Ala Tyr Leu Ala Leu Gln
 1220 1225 1230
 Val Ala Thr Tyr Lys Gly Trp Leu Glu Ile Met Asn Ala Ala Val Asp
 1235 1240 1245
 20 Ser Arg Glu Lys Asp Glu Gln Pro Asp Phe Glu Ala Asn Leu Tyr Ala
 1250 1255 1260
 Tyr Leu Tyr Phe Val Val Phe Ile Ile Phe Gly Ser Phe Phe Thr Leu
 1265 1270 1275 1280
 25 Asn Leu Phe Ile Gly Val Ile Ile Asp Asn Phe Asn Gln Gln Lys
 1285 1290 1295
 Lys Leu Gly Gly Gln Asp Ile Phe Met Thr Glu Glu Gln Lys Lys Tyr
 1300 1305 1310
 Tyr Asn Ala Met Lys Lys Leu Gly Thr Lys Lys Pro Gln Lys Pro Ile
 30 1315 1320 1325
 Pro Arg Pro Leu Asn Lys Cys Gln Ala Phe Val Phe Asp Leu Val Thr
 1330 1335 1340
 Ser Gln Val Phe Asp Val Ile Ile Leu Gly Leu Ile Val Leu Asn Met
 1345 1350 1355 1360

- 52 -

Ile Ile Met Met Ala Glu Ser Ala Asp Gln Pro Lys Asp Val Lys Lys
 1365 1370 1375

Thr Phe Asp Ile Leu Asn Ile Ala Phe Val Val Ile Phe Thr Ile Glu
 1380 1385 1390

Cys Leu Ile Lys Val Phe Ala Leu Arg Gln His Tyr Phe Thr Asn Gly
 5 1395 1400 1405

Trp Asn Leu Phe Asp Cys Val Val Val Leu Ser Ile Ile Ser Thr
 1410 1415 1420

Leu Val Ser Arg Leu Glu Asp Ser Asp Ile Ser Phe Pro Pro Thr Leu
 10 1425 1430 1435 1440

Phe Arg Val Val Arg Leu Ala Arg Ile Gly Arg Ile Leu Arg Leu Val
 1445 1450 1455

Arg Ala Ala Arg Gly Ile Arg Thr Leu Leu Phe Ala Leu Met Met Ser
 1460 1465 1470

Leu Pro Ser Leu Phe Asn Ile Gly Leu Leu Leu Phe Leu Val Met Phe
 15 1475 1480 1485

Ile Tyr Ala Ile Phe Gly Met Ser Trp Phe Ser Lys Val Lys Lys Gly
 1490 1495 1500

Ser Gly Ile Asp Asp Ile Phe Asn Phe Glu Thr Phe Thr Gly Ser Met
 20 1505 1510 1515 1520

Leu Cys Leu Phe Gln Ile Thr Thr Ser Ala Gly Trp Asp Thr Leu Leu
 1525 1530 1535

Asn Pro Met Leu Glu Ala Lys Glu His Cys Asn Ser Ser Gln Asp
 1540 1545 1550

Ser Cys Gln Gln Pro Gln Ile Ala Val Val Tyr Phe Val Ser Tyr Ile
 25 1555 1560 1565

Ile Ile Ser Phe Leu Ile Val Val Asn Met Tyr Ile Ala Val Ile Leu
 1570 1575 1580

Glu Asn Phe Asn Thr Ala Thr Glu Glu Ser Glu Asp Pro Leu Gly Glu
 30 1585 1590 1595 1600

Asp Asp Phe Glu Ile Phe Tyr Glu Val Trp Glu Lys Phe Asp Pro Glu
 1605 1610 1615

Ala Ser Gln Phe Ile Gln Tyr Ser Ala Leu Ser Asp Phe Ala Asp Ala
 1620 1625 1630

Leu Pro Glu Pro Leu Arg Val Ala Lys Pro Asn Lys Phe Gln Phe Leu
 35

- 53 -

	1635	1640	1645
	Val Met Asp Leu Pro Met Val Met Gly Asp Arg Leu His Cys Met Asp		
	1650	1655	1660
5	Val Leu Phe Ala Phe Thr Thr Arg Val Leu Gly Asp Ser Ser Gly Leu		
	1665	1670	1675
	Asp Thr Met Lys Thr Met Met Glu Glu Lys Phe Met Glu Ala Asn Pro		
	1685	1690	1695
	Phe Lys Lys Leu Tyr Glu Pro Ile Val Thr Thr Lys Arg Lys Glu		
10	1700	1705	1710
	Glu Glu Gln Gly Ala Ala Val Ile Gln Arg Ala Tyr Arg Lys His Met		
	1715	1720	1725
	Glu Lys Met Val Lys Leu Arg Leu Lys Asp Arg Ser Ser Ser Ser His		
	1730	1735	1740
15	Gln Val Phe Cys Asn Gly Asp Leu Ser Ser Leu Asp Val Ala Lys Val		
	1745	1750	1755
	Lys Val His Asn Asp		
	1765		

(4) INFORMATIONS POUR SEQ ID n° 3:

20 (I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 856 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) TYPE DE BRIN: simple
- (D) TOPOLOGIE: linéaire

25 (II) TYPE DE MOLECULE: ADNC

- (III) HYPOTHETIQUE: non
- (IV) ANTISENS: non
- (VI) SOURCE D'ORIGINE:

 - (A) ORGANISME: humain

30 (B) TYPE DE TISSU: ganglions de la racine dorsale

- (C) TYPE DE CELLULE: nerf périphérique

(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID n° 3:

35 ¹ GCTGAGCCAGT GGGGCACGTGA TATTTGAAGA TGTTCACCTT GAGAACCAAC

51 CCAAAATCCA AGAATTACTA AATTGTACTG ACATTATTT TACACATATT
 101 TTTATCCTGG AGATGGTACT AAAATGGGTA GCCTTCGGAT TTGGAAAGTA
 151 TTTCACCAAGT GCCTGGTGC GCCTTGATT CATCATTGTG ATTGTCTCTG
 5 201 TGACCACCCCT CATTAACCTA ATGGAATTGA AGTCCTTCCG GACTCTACGA
 251 GCACTGAGGC CTCTCGTGC GCTGTCCCAG TTTGAAGGAA TGAAGGTGGT
 301 GGTCAATGCT CTCATAGGTG CCATACCTGC CATTCTGAAT GTTTGCTTG
 351 TCTGCCTCAT TTTCTGGCTC GTATTTGTA TTCTGGAGT ATACTTCTTT
 10 401 TCTGGAAAAT TTGGGAAATG CATTAATGGA ACAGACTCAG TTATAAATTA
 451 TACCATCATT ACAAAATAAA GTCAATGTGA AAGTGGCAAT TTCTCTTGGA
 501 TCAACCAGAA AGTCAACTTT GACAATGTGG GAAATGCTTA CCTCGCTCTG
 15 551 CTGCAAGTGG CAACATTAA GGGCTGGATG GATATTATAT ATGCAGCTGT
 601 TGATTCCACA GAGAAAGAAC AACAGCCAGA GTTTGAGAGC AATTCACTCG
 651 GTTACATTTA CTTCGTAGTC TTTATCATCT TTGGCTCATT CTTCACTCTG
 701 AATCTCTTCA TTGGCGTTAT CATTGACAAC TTCAACCAAC AGCAGAAAAA
 20 751 GTTAGGTGGC CAAGACATTT TTATGACAGA AGAACAGAAG AAATACTATA
 801 ATGCAATGAA AAAATTAGGA TCCAAAAAAC CTCAAAAACC CATTCCACGG
 851 CCCGTT

25

(5) INFORMATIONS POUR SEQ ID n° 4:

(I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 702 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

30 (C) TYPE DE BRIN: simple

(D) TOPOLOGIE: linéaire

(II) TYPE DE MOLECULE: RT-PCR

(A) DESCRIPTION: /desc = "sonde d'ADN/
domaine IV"

35 (III) HYPOTHETIQUE: non

- 55 -

(IV) ANTISENS: non

(VI) SOURCE D'ORIGINE:

(A) ORGANISME: rat

(B) TYPE DE TISSU: ganglions de la racine dorsale

5

(C) TYPE DE CELLULE: nerf périphérique

(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID n° 4:

1	CTCAACATGG TTACGATGAT GGTGGAGACC GACGAGCAGG GCGAGGAGAA
10	51 GACGAAGGTT CTGGGCAGAA TCAACCAGTT CTTTGTGGCC GTCTTCACGG
	101 GCGAGTGTGT GATGAAGATG TTCGCCCTGC GACAGTACTA TTTCACCAAC
	151 GGCTGGAACG TGTTGACTT CATAGTGGTG ATCCTGTCCA TTGGGAGTCT
	201 GCTGTTCT GCAATCCTTA AGTCACTGGA AACTACTTC TCCCCGACGC
	251 TCTTCCGGGT CATCCGTCTG GCCAGGATCG GCCGCATCCT CAGGCTGATC
15	301 CGAGCAGCCA AGGGGATTCTG CACGCTGCTC TTGCCCCCTCA TGATGTCCCT
	351 GCCCCGCCCTC TTCAACATCG GCCTCCTCCT CTTCCCTCGTC ATGTTCATCT
	401 ACTCCATCTT CGGCATGGCC AGCTTCGCTA ACGTCGTGGA CGAGGCCGGC
	451 ATCGACGACA TGTTCAACTT CAAGACCTTT GGCAACAGCA TGCTGTGCCT
	501 GTTCCAGATC ACCACCTCGG CCGGCTGGGA CGGCCTCCTC AGCCCCATCC
20	551 TCAACACGGG GCCTCCCTAC TGCGACCCCA ACCTGCCCAA CAGCAACGGC
	601 TCCCAGGGGA ACTGCGGGAG CCCGGCGGTG GGCATCATCT TCTTCACCAC
	651 CTACATCATC ATCTCCTTCC TCATCGTGGT CAACATGTAT ATCGCAGTCA
	701 TC

(6) INFORMATIONS POUR SEQ ID n° 5:

25 (I) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 5 334 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) TYPE DE BRIN: simple

(D) TOPOLOGIE: linéaire

30 (II) TYPE DE MOLECULE: RT-PCR

(A) DESCRIPTION: ADNc

(III) HYPOTHETIQUE: non

(IV) ANTISENS: non

(VI) SOURCE D'ORIGINE:

35 (A) ORGANISME:

(B) TYPE DE TISSU:

(C) TYPE DE CELLULE:

(XI) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID n° 5:

5 1 GTCGACTCTA GATCAGGGTG AAGATGGAGG AGAGGTACTA CCCGGTGATC
51 51 TTCCC GGACG AGCGGAATT CCGCCCCCTTC ACTTCCGACT CTCTGGCTGC
101 101 CATAGAGAAG CGGATTGCTA TCCAAAAGGA GAGGAAGAAG TCCAAAGACA
151 151 AGGC GGCAGC TGAGCCCCAG CCTCGGCCTC AGCTTGACCT AAAGGCCTCC
10 201 AGGAAGTTAC CTAAGCTTTA TGGTGACATT CCCCCTGAGC TTGTAGCGAA
251 251 GCCTCTGGAA GACCTGGACC CATTCTACAA AGACCATAAG ACATTCACTGG
301 301 TGTTGAACAA GAAGAGAACA ATTTATCGCT TCAGGCCAA GCGGGCCTTG
351 351 TTCATTCTGG GCCCTTTAA TCCCCTCAGA AGCTTAATGA TTCGTATCTC
15 401 TGTCCATTCA GTCTTAGCA TGTCATCAT CTGCACGGTG ATCATCAACT
451 451 GTATGTTCAT GGC GAATTCT ATGGAGAGAA GTTTCGACAA CGACATTCCC
501 501 GAATACGTCT TCATTGGGAT TTATATTTA GAAGCTGTGA TTAAAATATT
20 551 GGCAAGAGGC TTCATTGTGG ATGAGTTTC CTTCCCTCCGA GATCCGTGGA
601 601 ACTGGCTGGA CTTCATTGTC ATTGGAACAG CGATCGCAAC TTGTTTCCG
651 651 GGCAGCCAAG TCAATTTTC AGCTCTCGT ACCTTCCGAG TGTTCAGAGC
701 701 TCTGAAGGCG ATTTCAGTTA TCTCAGGTCT GAAGGTCATC GTAGGTGCC
25 751 TGCTGCGCTC GGTGAAGAAG CTGGTAGACG TGATGGTCCT CACTCTCTC
801 801 TGCCTCAGCA TCTTGCCCT GGT CGGTCA CAGCTGTTCA TGGGAATTCT
851 851 GAACCAGAAG TGTATTAAGC ACAACTGTGG CCCCAACCCCT GCATCCAACA
901 901 AGGATTGCTT TGAAAAGGAA AAAGATAGCG AAGACTTCAT AATGTGTGGT
30 951 ACCTGGCTCG GCAGCAGACC CTGTCCCAAT GGTTCTACGT GCGATAAAAC

1001 CACATTGAAC CCAGACAATA ATTATACAAA GTTTGACAAC TTTGGCTGGT
1051 CCTTTCTCGC CATGTTCCGG GTTATGACTC AAGACTCCTG GGAGAGGCTT
1101 TACCGACAGA TCCTGCGGAC CTCTGGGATC TACTTTGTCT TCTTCTTCGT
1151 GGTGGTCATC TTCCCTGGCT CCTTCTACCT GCTTAACCTA ACCCTGGCTG
1201 TTGTCACCAT GGCTTATGAA GAACAGAAC AAAATGTAGC TGCTGAGACA
1251 GAGGCCAAGG AGAAAATGTT TCAGGAAGCC CAGCAGCTGT TAAGGGAGGA
1301 GAAGGGAGGCT CTGGTTGCCA TGGGAATTGA CAGAAGTTCC CTTAATTCCC
1351 TTCAAGCTTC ATCCTTTCC CGAAGAAAGA GGAAGTTTT CGGTAGTAAG
1401 ACAAGAAAGT CCTCTTTAT GAGAGGGTCC AAGACGGCCC AAGCCTCAGC
1451 GTCTGATTCA GAGGACGATG CCTCTAAAAA TCCACAGCTC CTTGAGCAGA
1501 CCAAACGACT GTCCCAGAAC TTGCCAGTGG ATCTCTTGA TGAGCACGTG
1551 GACCCCCCTCC ACAGGCAGAG AGCGCTGAGC GCTGTCAGTA TCTTAACCAT
1601 CACCATGCAG GAACAAGAAA ATTCCAGGA GCCTTGTTC CCATGTGGGA
1651 AAAATTGGC CTCTAAGTAC CTGGTGTGGG ACTGTAGCCC TCAGTGGCTG
1701 TGCATAAAGA AGGCCTGCG GACCATCATG ACGGATCCCT TTACTGAGCT
1751 GGCCATCACC ATCTGCATCA TCATCAATAC CGTTTCTTA GCCGTGGAGC
1801 ACCACAACAT GGATGACAAC TTAAAGACCA TACTGAAAAT AGGAAACTGG
1851 GTTTCACGG GAATTTCAT AGCGGAAATG TGTCTCAAGA TCATCGCGCT
1901 CGACCCTTAC CACTACTTCC GGCACGGCTG GAATGTTTT GACAGCATCG
1951 TGGCCCTCCT GAGTCTCGCT GATGTGCTCT ACAACACACT GTCTGATAAC
2001 AATAGGTCTT TCTTGGCTTC CCTCAGAGTG CTGAGGGTCT TCAAGTTAGC
2051 CAAATCCTGG CCCACGTTAA ACACCTCAT TAAGATCATC GGCCACTCCG
2101 TGGCGCGCT TGGAAACCTG ACTGTGGTCC TGACTATCGT GGTCTTCATC
2151 TTTCTGTGG TGGGCATGCG GCTCTCGGC ACCAAGTTA ACAAGACCGC
2201 CTACGCCACC CAGGAGCGGC CCAGGCCGGCG CTGGCACATG GATAATTCT
2251 ACCACTCCTT CCTGGTGGTG TTCCGCATCC TCTGTGGGGA ATGGATCGAG
2301 AACATGTGGG GCTGCATGCA GGATATGGAC GGCTCCCCGT TGTGCATCAT
2351 TGTCTTGTC CTGATAATGG TGATCGGAA GCTTGTGGTG CTTAACCTCT

2401 TCATTGCCTT GCTGCTCAAT TCCTTCAGCA ATGAGGAGAA GGATGGGAGC
2451 CTGGAAGGAG AGACCAAGGAA AACCAAAGTG CAGCTAGCCC TGGATCGGTT
2501 CCGCCGGGCC TTCTCCTTCA TGCTGCACGC TCTTCAGAGT TTTTGTGCA
2551 AGAAATGCAG GAGGAAAAAC TCGCCAAAGC CAAAAGAGAC AACAGAAAGC
2601 TTTGCTGGTG AGAATAAAGA CTCAATCCTC CCGGATGCGA GGCCCTGGAA
2651 GGAGTATGAT ACAGACATGG CTTTGTACAC TGGACAGGCC GGGGCTCCGC
2701 TGGCCCCACT CGCAGAGGTA GAGGACGATG TGGAAATATTG TGGTGAAGGC
2751 GGTGCCCTAC CCACCTCACA ACATAGTGCT GGAGTTCAAGG CCGGTGACCT
2801 CCCTCCAGAG ACCAACGAGC TCACTAGCCC GGATGACCAA GGGGTTGAAA
2851 TGGAAAGTATT TTCTGAAGAA GATCTGCATT TAAGCATACA GAGTCCTCGA
2901 AAGAAGTCTG ACGCAGTGAG CATGCTCTCG GAATGCAGCA CAATTGACCT
2951 GAATGATATC TTTAGAAATT TACAGAAAAC AGTTTCCCCC AAAAAGCAGC
3001 CAGATAGATG CTTTCCAAG GGCCTTAGTT GTCACTTTCT ATGCCACAAA
3051 ACAGACAAGA GAAAGTCCCC CTGGGTCTG TGGTGGAAACA TTCGGAAAAC
3101 CTGCTACCAA ATCGTGAAGC ACAGCTGGTT TGAGAGTTTC ATAATCTTG
3151 TTATTCTGCT GAGCAGTGGA GCGCTGATAT TTGAAGATGT CAATCTCCCC
3201 AGCCGGCCCC AAGTTGAGAA ATTACTAAGG TGTACCGATA ATATTTCAC
3251 ATTTATTTTC CTCCTGGAAA TGATCCTGAA GTGGGTGGCC TTTGGATTCC
3301 GGAGGTATTT CACCAGTGCC TGGTGCTGGC TTGATTTCT CATTGTGGTG
2251 GTGTCTGTGC TCAGTCTCAT GAATCTACCA AGCTTGAAGT CCTTCCGGAC
3401 TCTGCGGGCC CTGAGACCTC TGCGGGCGCT GTCCCAGTTT GAAGGAATGA
3451 AGGTTGTCGT CTACGCCCTG ATCAGCGCCA TACCTGCCAT TCTCAATGTC
3501 TTGCTGGTCT GCCTCATTCTT CTGGCTCGTA TTTTGTATCT TGGGAGTAAA
3551 TTTATTTCT GGGAAAGTTTGAAGGGTCAT TAACGGGACA GACATAAATA
3601 TGTATTTGGA TTTTACCGAA GTTCCGAACC GAAGCCAATG TAACATTAGT
3651 AATTACTCGT GGAAGGTCCC GCAGGTCAAC TTTGACAACG TGGGAAATGC
3701 CTATCTGCC CTGCTGCAAG TGGCAACCTA TAAGGGCTGG CTGGAAATCA
3751 TGAATGCTGC TGTCGATTCC AGAGAGAAAG ACGAGCAGCC GGACTTTGAG

3801 GCGAACCTCT ACGCGTATCT CTACTTTGTG GTTTTATCA TCTTCGGCTC
3851 CTTCTTACC CTGAACCTCT TTATCGGTGT TATTATTGAC AACTTCAATC
3901 AGCAGCAGAA AAAGTTAGGT GGCCAAGACA TCTTGTGAC TGAGGAGCAG
3951 AAGAAATATT ACAATGCAAT GAAAAAGTTA GGAACCAAGA AACCTCAAAA
4001 GCCCATCCCAGGCCCTGA ACAAAATGTCA AGCCTTTGTG TTGACCTGG
4051 TCACAAAGCCA GGTCTTGAC GTCATCATTC TGGGTCTTAT TGTCTTAAAT
4101 ATGATTATCA TGATGGCTGA ATCTGCCGAC CAGCCAAAG ATGTGAAGAA
4151 AACCTTGAT ATCCTCAACA TAGCCTTCGT GGTCACTTT ACCATAGAGT
4201 GTCTCATCAA AGTCTTGCT TTGAGGCAAC ACTACTCAC CAATGGCTGG
4251 AACTTATTTG ATTGTGTGGT CGTGGTTCTT TCTATCATT GTACCCCTGGT
4301 TTCCCCGCTTG GAGGACAGTG ACATTTCTT CCCGCCACG CTCTTCAGAG
4351 TCGTCCGCTT GGCTCGGATT GGTCGAATCC TCAGGCTGGT CCGGGCTGCC
4401 CGGGGAATCA GGACCCCTCCT CTTGCTTTG ATGATGTCTC TCCCCCTCTCT
4451 CTTCAACATC GGTCTGCTGC TCTTCCTGGT GATGTTCATT TACGCCATCT
4501 TTGGGATGAG CTGGTTTCC AAAGTGAAGA AGGGCTCCGG GATCGACGAC
4551 ATCTTCAACT TCGAGACCTT TACGGGCAGC ATGCTGTGCC TCTTCCAGAT
4601 AACCACTTCG GCTGGCTGGG ATACCCCTCCT CAACCCCATG CTGGAGGCAA
4651 AAGAACACTG CAACTCCTCC TCCCAAGACA GCTGTCAGCA GCCGCAGATA
4701 GCCGTCGTCT ACTTCGTCAAG TTACATCATC ATCTCCTTCC TCATCGTGGT
4751 CAACATGTAC ATCGCTGTGA TCCTCGAGAA CTTCAACACA GCCACGGAGG
4801 AGAGCGAGGA CCCTCTGGGA GAGGACGACT TTGAAATCTT CTATGAGGTC
4851 TGGGAGAAGT TTGACCCCGA GGCGTCGCAG TTCATCCAGT ATTCCGGCCCT
4901 CTCTGACTTT GCGGACGCC TGCCGGAGCC GTTGCCTGTG GCCAAGCCGA
4951 ATAAGTTCA GTTTCTAGTG ATGGACTTGC CCATGGTGAT GGGCGACCGC
5001 CTCCATTGCA TGGATGTTCT CTTGCTTTCA ACTACCAGGG TCCTCGGGGA
5051 CTCCAGCGGC TTGGATACCA TGAAAACCAC GATGGAGGAG AAGTTTATGG
5101 AGGCCAACCC TTTTAAGAAG CTCTACGAGC CCATAGTCAC CACCACCAAG
5151 AGGAAGGAGG AGGAGCAAGG CGCCGCCGTC ATCCAGAGGG CCTACCGGAA

- 60 -

5201 ACACATGGAG AAGATGGTCA AACTGAGGCT GAAGGCACAGG TCAAGTTCAT
5251 CGCACCCAGGT GTTTTGCAAT GGAGACTTGT CCAGCTTGGA TGTGGCCAAG
5301 GTCAAGGTTC ACAATGACTG AACCCCTCATC TAGA

5

REVENDICATIONS

1. Séquence d'ADN isolée, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence nucléotidique indiquée dans SEQ ID n° 1 et SEQ ID n° 3.
- 5 2. ADN selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite séquence d'ADN code pour une protéine de canal sodique ou un fragment de celle-ci.
- 10 3. ADN selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite protéine de canal sodique est la sous-unité α ou un fragment de celle-ci.
4. ADN selon la revendication 3, caractérisé en ce que ladite protéine de canal sodique est résistante à la tétrodotoxine.
- 15 5. ADN selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce que ladite protéine de canal sodique se rencontre chez des mammifères.
6. ADN selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce que ladite protéine de canal sodique se rencontre chez le rat.
- 20 7. ADN selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce que ladite protéine de canal sodique se rencontre chez l'homme.
8. ADN selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit ADN est de l'ADNc.
- 25 9. ADN selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit ADN est de l'ADN synthétique.
10. Vecteurs d'expression, caractérisés en ce qu'ils comprennent l'ADN de la revendication 8.
- 30 11. Vecteurs d'expression, caractérisés en ce qu'ils comprennent l'ADN synthétique de la revendication 9.
12. Cellules hôtes transformées par les vecteurs d'expression de la revendication 10.
- 35 13. Cellules hôtes transformées par les vecteurs d'expression de la revendication 11.

14. Polynucléotide recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique provenant de la séquence d'ADN de la revendication 1.

15. Protéine de canal sodique codée par un ADN 5 selon les revendications 1 à 9 ou des variants allèles de celui-ci.

16. Protéine de canal sodique résistante à la tétrodotoxine, codée par un ADN selon les revendications 1 à 9 ou des variants allèles de celui-ci.

10 17. Protéine selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence d'aminoacides indiquée dans SEQ ID n° 2.

15 18. Procédé d'identification d'inhibiteurs de la protéine de canal sodique résistante à la tétrodotoxine, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact d'un composé, soupçonné être un tel inhibiteur, avec la protéine de canal sodique de la revendication 16, et la mesure de l'activité de ladite protéine de canal sodique exprimée.

20 19. Anticorps poly- et/ou monoclonaux, suscités contre une protéine de canal sodique résistante à la tétrodotoxine, codée par un ADN des revendications 1 à 9 ou des variants allèles de celui-ci.

25 20. Nécessaire de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide selon la revendication 14, capable de s'hybrider spécifiquement avec une protéine de canal sodique résistante à la tétrodotoxine ou un fragment d'une telle protéine.

30 21. Utilisation d'une séquence d'ADN isolée selon les revendications 1 à 9, pour l'identification d'un composé soupçonné être un inhibiteur de protéine de canal sodique résistante à la tétrodotoxine.

1/27

Figure 1A: SEQ ID NO:1

1 GAAAGTCACAG GAGTGTCTGT CAGCGAGAGG AAGAAGGGAG AGTTTACTGA
51 GTGTCTTCTG CCCCTCCTCA GGGTGAAGAT GGAGGAGAGG TACTACCCGG
101 TGATCTTCCC GGACGAGCGG AATTTCGCC CCTTCACTTC CGACTCTCTG
151 GCTGCCATAG AGAACCGGAT TGCTATCCAA AAGGAGAGGA AGAAGTCCAA
201 AGACAAGGCG GCAGCTGAGC CCCAGCCTCG GCCTCAGCTT GACCTAAAGG
251 CCTCCAGGAA GTTACCTAAG CTTTATGGTG ACATTCCCC TGAGCTTGTA
301 GCGAAGCCTC TGGAAGACCT GGACCCATTC TACAAAGACC ATAAGACATT
351 CATGGTGTG AACAAGAAGA GAACAATTAA TCGCTTCAGC GCCAAGCGGG
401 CCTTGTTCAT TCTGGGCCT TTTAATCCCC TCAGAAGCTT AATGATTCGT
451 ATCTCTGTCC ATTCA GTCTT TAGCATGTTC ATCATCTGCA CGGTGATCAT
501 CAACTGTATG TTCATGGCGA ATTCTATGGA GAGAAGTTTC GACAACGACA
551 TTCCCGAATA CGTCTTCATT GGGATTATA TTTTAGAAGC TGTGATTAAA
601 ATATTGGCAA GAGGCTTCAT TGTGGATGAG TTTTCCTTCC TCCGAGATCC
651 GTGGAACTGG CTGGACTTCA TTGTCATTGG AACAGCGATC GCAACTTGT
701 TTCCGGGCAG CCAAGTCAAT CTTTCAGCTC TTCGTACCTT CCGAGTGTTC
751 AGAGCTCTGA AGGCGATTT AGTTATCTCA GGTCTGAAGG TCATCGTAGG
801 TGCCCTGCTG CGCTCGGTGA AGAAGCTGGT AGACGTGATG GTCCTCACTC
851 TCTTCTGCCT CAGCATCTT GCCCTGGTCG GTCAGCAGCT GTTCATGGGA
901 ATTCTGAACC AGAAGTGTAT TAAGCACAAAC TGTGGCCCCA ACCCTGCATC
951 CAACAAGGAT TGCTTGAAA AGGAAAAAGA TAGCGAAGAC TTCATAATGT
1001 GTGGTACCTG GCTCGGCAGC AGACCCGTGC CCAATGGTTC TACGTGCGAT
1051 AAAACCACAT TGAACCCAGA CAATAATTAT ACAAAAGTTG ACAACTTTGG
1101 CTGGTCCTT CTCGCCATGT TCCGGGTTAT GACTCAAGAC TCCTGGGAGA
1151 GGCTTTACCG ACAGATCCTG CGGACCTCTG GGATCTACTT TGTCTTCTTC
1201 TTGCGTGGTGG TCATCTTCCTT GGGCTCCTTC TACCTGCTTA ACCTAACCCCT

Figure 1B: SEQ ID NO:1

1251 GGCTGTTGTC ACCATGGCTT ATGAAGAAC A AACAGAAAT GTAGCTGCTG
 1301 AGACAGAGGC CAAGGAGAAA ATGTTTCAGG AAGCCCAGCA GCTGTTAAGG
 1351 GAGGAGAAGG AGGCTCTGGT TGCCATGGGA ATTGACAGAA GTTCCCTTAA
 1401 TTCCCTTCAA GCTTCATCCT TTTCCCCGAA GAAGAGGAAG TTTTCGGTA
 1451 GTAAGACAAG AAAGTCCTTC TTTATGAGAG GGTCCAAGAC GGCCCAAGCC
 1501 TCAGCGTCTG ATTCA GAGGA CGATGCCTCT AAAAATCCAC AGCTCCTTGA
 1551 GCAGACCAAA CGACTGTCCC AGAAC TTGCC AGTGGATCTC TTTGATGAGC
 1601 ACGTGGACCC CCTCCACAGG CAGAGAGCGC TGAGCGCTGT CAGTATCTTA
 1651 ACCATCACCA TGCAGGAACA AGAAAAATT CAGGAGCCTT GTTTCCCAGT
 1701 TGGGAAAAT TTGGCCTCTA AGTACCTGGT GTGGGACTGT AGCCCTCAGT
 1751 GGCTGTGCAT AAAGAAGGTC CTGCGGACCA TCATGACGGA TCCCTTTACT
 1801 GAGCTGGCCA TCACCATCTG CATCATCATC AATACC GTTT TCTTAGCCGT
 1851 GGAGCACCAC AACATGGATG ACAACTTAAA GACCATACTG AAAATAGGAA
 1901 ACTGGGTTTT CACGGGAATT TTCATAGCGG AAATGTGTCT CAAGATCATC
 1951 GCGCTCGACC CTTACCACTA CTTCCGGCAC GGCTGGAATG TTTTGACAG
 2001 CATCGTGGCC CTCCTGAGTC TCGCTGATGT GCTCTACAAC ACAGTGTCTG
 2051 ATAACAATAG GTCTTTCTTG GCTTCCCTCA GAGTGCTGAG GGTCTTCAAG
 2101 TTAGCCAAAT CCTGGCCAC GTTAAACACT CTCATTAAGA TCATCGGCCA
 2151 CTCCGTGGC GCGCTTGGAA ACCTGACTGT GGTCTGACT ATCGTGGTCT
 2201 TCATCTTTTC TGTGGTGGC ATGCGGCTCT TCGGCACCAA GTTTAACAAAG
 2251 ACCGCCTACG CCACCCAGGA GCGGCCAGG CGCGCCTGGC ACATGGATAAA
 2301 TTTCTACCAC TCCTTCCTGG TGGTGTCCG CATCCTCTGT GGGAAATGGA
 2351 TCGAGAACAT GTGGGGCTGC ATGCAGGATA TGGACGGCTC CCCGTTGTGC
 2401 ATCATTGTCT TTGTCCTGAT AATGGTGATC GGGAAAGCTTG TGGTGCTTAA

3/27

Figure 1C: SEQ ID NO:1

2451 CCTCTTCATT GCCTTGCTGC TCAATTCCCT CAGCAATGAG GAGAAGGATG
2501 GGAGCCTGGA AGGAGAGACC AGGAAAACCA AAGTGCAGCT AGCCCTGGAT
2551 CGGTTCCGCC GGGCCTTCTC CTTCATGCTG CACGCTCTTC AGAGTTTTG
2601 TTGCAAGAAA TGCAGGAGGA AAAACTCGCC AAAGCCAAA GAGACAACAG
2651 AAAGCTTTGC TGGTGAGAAT AAAGACTCAA TCCTCCCGGA TGCGAGGCC
2701 TGGAAGGAGT ATGATAACAGA CATGGCTTG TACACTGGAC AGGCCGGGGC
2751 TCCGCTGGCC CCACTCGCAG AGGTAGAGGA CGATGTGGAA TATTGTGGTG
2801 AAGGCGGTGC CCTACCCACC TCACAACATA GTGCTGGAGT TCAGGCCGGT
2851 GACCTCCCTC CAGAGACCAA GCAGCTCACT AGCCCCGGATG ACCAAGGGGT
2901 TGAAATGGAA GTATTTCTG AAGAAGATCT GCATTTAACGC ATACAGAGTC
2951 CTCGAAAGAA GTCTGACGCA GTGAGCATGC TCTCGGAATG CAGCACAAATT
3001 GACCTGAATG ATATCTTAG AAATTTACAG AAAACAGTTT CCCCCAAAAAA
3051 GCAGCCAGAT AGATGCTTTC CCAAGGGCCT TAGTTGTAC TTTCTATGCC
3101 ACAAAACAGA CAAGAGAAAG TCCCCCTGGG TCCTGTGGTG GAACATTCGG
3151 AAAACCTGCT ACCAAATCGT GAAGCACAGC TGGTTTGAGA GTTTCATAAT
3201 CTTTGTATT CTGCTGAGCA GTGGAGCGCT GATATTTGAA GATGTCAATC
3251 TCCCCAGCCG GCCCCAAGTT GAGAAATTAC TAAGGTGTAC CGATAATATT
3301 TTCACATTAA TTTTCCTCCT GGAAATGATC CTGAAGTGGG TGGCCTTTGG
3351 ATTCCGGAGG TATTCACCA GTGCCTGGTG CTGGCTTGAT TTCCCTCATTG
3401 TGGTGGTGTGTC TGTGCTCAGT CTCATGAATC TACCAAGCTT GAAGTCCTTC
3451 CGGACTCTGC GGGCCCTGAG ACCTCTGCGG GCGCTGTCCC AGTTGAAGG
3501 AATGAAGGTT GTCGTCTACG CCCTGATCAG CGCCATACCT GCCATTCTCA
3551 ATGTCTTGCT GGTCTGCCTC ATTTCTGGC TCGTATTTG TATCTTGGGA
3601 GTAAATTTAT TTTCTGGAA GTTTGGAAGG TGCATTAACG GGACAGACAT

Figure 1D: SEQ ID NO:1

3651 AAATATGTAT TTGGATTAA CCGAAGTTCC GAACCGAACG CAATGTAACA
3701 TTAGTAATTA CTCGTGGAAG GTCCCGCAGG TCAACTTGA CAACGTGGGG
3751 AATGCCTATC TCGCCCTGCT GCAAGTGGCA ACCTATAAGG GCTGGCTGGA
3801 AATCATGAAT GCTGCTGTCG ATTCCAGAGA GAAAGACGAG CAGCCGGACT
3851 TTGAGGCGAA CCTCTACGCG TATCTCTACT TTGTGGTTT TATCATCTTC
3901 GGCTCCTTCT TTACCCCTGAA CCTCTTTATC GGTGTTATTA TTGACAACTT
3951 CAATCAGCAG CAGAAAAAGT TAGGTGGCCA AGACATTTT ATGACAGAAG
4001 AACAGAAGAA ATATTACAAT GCAATGAAAA AGTTAGGAAC CAAGAAACCT
4051 CAAAAGCCC TCCCAAGGCC CCTGAACAAA TGTCAAGCCT TTGTGTTCGA
4101 CCTGGTCACA AGCCAGGTCT TTGACGTCAT CATTCTGGT CTTATTGTCT
4151 TAAATATGAT TATCATGATG GCTGAATCTG CCGACCAGCC CAAAGATGTG
4201 AAGAAAACCT TTGATATCCT CAACATAGCC TTCGTGGTCA TCTTTACCAT
4251 AGAGTGTCTC ATCAAAGTCT TTGCTTGAG GCAACACTAC TTCACCAATG
4301 GCTGGAACCT ATTTGATTGT GTGGTCGTGG TTCTTCTAT CATTAGTACC
4351 CTGGTTTCCC GCTTGGAGGA CAGTGACATT TCTTCCCAG CCACGCTCTT
4401 CAGAGTCGTC CGCTTGGCTC GGATTGGTCG AATCCTCAGG CTGGTCCGGG
4451 CTGCCCGGGG AATCAGGACC CTCCTCTTG CTTTGATGAT GTCTCTCCCC
4501 TCTCTCTTCA ACATCGGTCT GCTGCTCTTC CTGGTGATGT TCATTTACGC
4551 CATCTTGAGG ATGAGCTGGT TTTCCAAAGT GAAGAAGGGC TCCGGGATCG
4601 ACGACATCTT CAACTTCGAG ACCTTACGG GCAGCATGCT GTGCCTCTTC
4651 CAGATAACCA CTTCGGCTGG CTGGGATACC CTCCTCAACC CCATGCTGGA
4701 GGCAAAAGAA CACTGCAACT CCTCCTCCCA AGACAGCTGT CAGCAGCCGC
4751 AGATAGCCGT CGTCTACTTC GTCAGTTACA TCATCATCTC CTTCTCATC
4801 GTGGTCAACA TGTACATCGC TGTGATCCTC GAGAACTTCA ACACAGCCAC

5/27

Figure 1E: SEQ ID NO: 1

4851 GGAGGAGAGC GAGGACCCCTC TGGGAGAGGA CGACTTTGAA ATCTTCTATG
4901 AGGTCTGGGA GAAGTTGAC CCCGAGGCCT CGCAGTTCAT CCAGTATTCTG
4951 GCCCTCTCTG ACTTTGCGGA CGCCCTGCCG GAGCCGTTGC GTGTGGCCAA
5001 GCCGAATAAG TTTCAGTTTC TAGTGATGGA CTTGCCCATG GTGATGGGCG
5051 ACCGCCTCCA TTGCATGGAT GTTCTCTTG CTTTCACTAC CAGGGTCCTC
5101 GGGGACTCCA GCGGCTTGGGA TACCATGAAA ACCATGATGG AGGAGAAGTT
5151 TATGGAGGCC AACCCCTTTA AGAACGCTCTA CGAGCCCATA GTCACCACCA
5201 CCAAGAGGAA GGAGGAGGAG CAAGGCCTCG CCGTCATCCA GAGGGCCTAC
5251 CGGAAACACA TGGAGAAGAT GGTCAAACGT AGGCTGAAGG ACAGGTCAAG
5301 TTCATCGCAC CAGGTGTTT GCAATGGAGA CTTGTCCAGC TTGGATGTGG
5351 CCAAGGTCAA GGTTCACAAT GACTGAACCC TCATCTCCAC CCCTACCTCA
5401 CTGCCTCAC A GCTTAGCCTC CAGCCTCTGG CGAGCAGGCG GCAGACTCAC
5451 TGAACACAGG CCGTTCGATC TGTGTTTTG GCTGAACGAG GTGACAGGTT
5501 GGCCTCCATT TTTAAATGAC TCTTGGAAAG ATTTCATGTA GAGAGATGTT
5551 AGAAGGGACT GCAAAGGACA CCGACCATAA CGGAAGGCCT GGAGGACAGT
5601 CCAACTTACA TAAAGATGAG AAACAAGAAG GAAAGATCCC AGGAAAACCTT
5651 CAGATTGTGT TCTCAGTACA TCCCCCAATG TGTCTGTTCG GTGTTTGAG
5701 TATGTGACCT GCCACATGTA GCTCTTTT GCATGTACGT CAAAACCTG
5751 CAGTAAGTTG ATAGCTTGCT ACGGGTGTTC CTACCAGCAT CACAGAATTG
5801 GGTGTATGAC TCAAACCTAA AAGCATGACT CTGACTTGTC AGTCAGCACC
5851 CCGACTTTCA GACGCTCCAA TCTCTGTCAGGAGTGTCTAA CGAATAAATA
5901 GGTAAAAG

6/27

Figure 2A: SEQ ID NO: 2

Met Glu Glu Arg Tyr Tyr Pro Val Ile Phe Pro Asp Glu Arg Asn Phe
 1 5 10 15
 Arg Pro Phe Thr Ser Asp Ser Leu Ala Ala Ile Glu Lys Arg Ile Ala
 20 25 30
 Ile Gln Lys Glu Arg Lys Lys Ser Lys Asp Lys Ala Ala Ala Glu Pro
 35 40 45
 Gln Pro Arg Pro Gln Leu Asp Leu Lys Ala Ser Arg Lys Leu Pro Lys
 50 55 60
 Leu Tyr Gly Asp Ile Pro Pro Glu Leu Val Ala Lys Pro Leu Glu Asp
 65 70 75 80
 Leu Asp Pro Phe Tyr Lys Asp His Lys Thr Phe Met Val Leu Asn Lys
 85 90 95
 Lys Arg Thr Ile Tyr Arg Phe Ser Ala Lys Arg Ala Leu Phe Ile Leu
 100 105 110
 Gly Pro Phe Asn Pro Leu Arg Ser Leu Met Ile Arg Ile Ser Val His
 115 120 125
 Ser Val Phe Ser Met Phe Ile Ile Cys Thr Val Ile Ile Asn Cys Met
 130 135 140
 Phe Met Ala Asn Ser Met Glu Arg Ser Phe Asp Asn Asp Ile Pro Glu
 145 150 155 160
 Tyr Val Phe Ile Gly Ile Tyr Ile Leu Glu Ala Val Ile Lys Ile Leu
 165 170 175
 Ala Arg Gly Phe Ile Val Asp Glu Phe Ser Phe Leu Arg Asp Pro Trp
 180 185 190
 Asn Trp Leu Asp Phe Ile Val Ile Gly Thr Ala Ile Ala Thr Cys Phe
 195 200 205
 Pro Gly Ser Gln Val Asn Leu Ser Ala Leu Arg Thr Phe Arg Val Phe
 210 215 220
 Arg Ala Leu Lys Ala Ile Ser Val Ile Ser Gly Leu Lys Val Ile Val
 225 230 235 240
 Gly Ala Leu Leu Arg Ser Val Lys Lys Leu Val Asp Val Met Val Leu
 245 250 255
 Thr Leu Phe Cys Leu Ser Ile Phe Ala Leu Val Gly Gln Gln Leu Phe
 260 265 270
 Met Gly Ile Leu Asn Gln Lys Cys Ile Lys His Asn Cys Gly Pro Asn
 275 280 285

2771103

7/27

Pro Ala Ser Asn Lys Asp Cys Phe Glu Lys Glu Lys Asp Ser Glu Asp
290 295 300
Phe Ile Met Cys Gly Thr Trp Leu Gly Ser Arg Pro Cys Pro Asn Gly
305 310 315 320

8/27

Figure 2B: SEQ ID NO: 2

Ser Thr Cys Asp Lys Thr Thr Leu Asn Pro Asp Asn Asn Tyr Thr Lys
 325 330 335
 Phe Asp Asn Phe Gly Trp Ser Phe Leu Ala Met Phe Arg Val Met Thr
 340 345 350
 Gln Asp Ser Trp Glu Arg Leu Tyr Arg Gln Ile Leu Arg Thr Ser Gly
 355 360 365
 Ile Tyr Phe Val Phe Phe Val Val Ile Phe Leu Gly Ser Phe
 370 375 380
 Tyr Leu Leu Asn Leu Thr Leu Ala Val Val Thr Met Ala Tyr Glu Glu
 385 390 395 400
 Gln Asn Arg Asn Val Ala Ala Glu Thr Glu Ala Lys Glu Lys Met Phe
 405 410 415
 Gln Glu Ala Gln Gln Leu Leu Arg Glu Glu Lys Glu Ala Leu Val Ala
 420 425 430
 Met Gly Ile Asp Arg Ser Ser Leu Asn Ser Leu Gln Ala Ser Ser Phe
 435 440 445
 Ser Pro Lys Lys Arg Lys Phe Phe Gly Ser Lys Thr Arg Lys Ser Phe
 450 455 460
 Phe Met Arg Gly Ser Lys Thr Ala Gln Ala Ser Ala Ser Asp Ser Glu
 465 470 475 480
 Asp Asp Ala Ser Lys Asn Pro Gln Leu Leu Glu Gln Thr Lys Arg Leu
 485 490 495
 Ser Gln Asn Leu Pro Val Asp Leu Phe Asp Glu His Val Asp Pro Leu
 500 505 510
 His Arg Gln Arg Ala Leu Ser Ala Val Ser Ile Leu Thr Ile Thr Met
 515 520 525
 Gln Glu Gln Glu Lys Phe Gln Glu Pro Cys Phe Pro Cys Gly Lys Asn
 530 535 540
 Leu Ala Ser Lys Tyr Leu Val Trp Asp Cys Ser Pro Gln Trp Leu Cys
 545 550 555 560
 Ile Lys Lys Val Leu Arg Thr Ile Met Thr Asp Pro Phe Thr Glu Leu
 565 570 575
 Ala Ile Thr Ile Cys Ile Ile Ile Asn Thr Val Phe Leu Ala Val Glu
 580 585 590
 His His Asn Met Asp Asp Asn Leu Lys Thr Ile Leu Lys Ile Gly Asn

2771103

9/27

595

600

605

Trp Val Phe Thr Gly Ile Phe Ile Ala Glu Met Cys Leu Lys Ile Ile

610

615

620

10/27

Figure 2C: SEQ ID NO: 2

Ala Leu Asp Pro Tyr His Tyr Phe Arg His Gly Trp Asn Val Phe Asp
 625 630 635 640
 Ser Ile Val Ala Leu Leu Ser Leu Ala Asp Val Leu Tyr Asn Thr Leu
 645 650 655
 Ser Asp Asn Asn Arg Ser Phe Leu Ala Ser Leu Arg Val Leu Arg Val
 660 665 670
 Phe Lys Leu Ala Lys Ser Trp Pro Thr Leu Asn Thr Leu Ile Lys Ile
 675 680 685
 Ile Gly His Ser Val Gly Ala Leu Gly Asn Leu Thr Val Val Leu Thr
 690 695 700
 Ile Val Val Phe Ile Phe Ser Val Val Gly Met Arg Leu Phe Gly Thr
 705 710 715 720
 Lys Phe Asn Lys Thr Ala Tyr Ala Thr Gln Glu Arg Pro Arg Arg Arg
 725 730 735
 Trp His Met Asp Asn Phe Tyr His Ser Phe Leu Val Val Phe Arg Ile
 740 745 750
 Leu Cys Gly Glu Trp Ile Glu Asn Met Trp Gly Cys Met Gln Asp Met
 755 760 765
 Asp Gly Ser Pro Leu Cys Ile Ile Val Phe Val Leu Ile Met Val Ile
 770 775 780
 Gly Lys Leu Val Val Leu Asn Leu Phe Ile Ala Leu Leu Leu Asn Ser
 785 790 795 800
 Phe Ser Asn Glu Glu Lys Asp Gly Ser Leu Glu Gly Glu Thr Arg Lys
 805 810 815
 Thr Lys Val Gln Leu Ala Leu Asp Arg Phe Arg Arg Ala Phe Ser Phe
 820 825 830
 Met Leu His Ala Leu Gln Ser Phe Cys Cys Lys Cys Arg Arg Lys
 835 840 845
 Asn Ser Pro Lys Pro Lys Glu Thr Thr Glu Ser Phe Ala Gly Glu Asn
 850 855 860
 Lys Asp Ser Ile Leu Pro Asp Ala Arg Pro Trp Lys Glu Tyr Asp Thr
 865 870 875 880
 Asp Met Ala Leu Tyr Thr Gly Gln Ala Gly Ala Pro Leu Ala Pro Leu
 885 890 895

2771103

11/27

Ala Glu Val Glu Asp Asp Val Glu Tyr Cys Gly Glu Gly Gly Ala Leu

900

905

910

12/27
Figure 2D: SEQ ID NO: 2

Pro Thr Ser Gln His Ser Ala Gly Val Gln Ala Gly Asp Leu Pro Pro
 915 920 925
 Glu Thr Lys Gln Leu Thr Ser Pro Asp Asp Gln Gly Val Glu Met Glu
 930 935 940
 Val Phe Ser Glu Glu Asp Leu His Leu Ser Ile Gln Ser Pro Arg Lys
 945 950 955 960
 Lys Ser Asp Ala Val Ser Met Leu Ser Glu Cys Ser Thr Ile Asp Leu
 965 970 975
 Asn Asp Ile Phe Arg Asn Leu Gln Lys Thr Val Ser Pro Lys Lys Gln
 980 985 990
 Pro Asp Arg Cys Phe Pro Lys Gly Leu Ser Cys His Phe Leu Cys His
 995 1000 1005
 Lys Thr Asp Lys Arg Lys Ser Pro Trp Val Leu Trp Trp Asn Ile Arg
 1010 1015 1020
 Lys Thr Cys Tyr Gln Ile Val Lys His Ser Trp Phe Glu Ser Phe Ile
 1025 1030 1035 1040
 Ile Phe Val Ile Leu Leu Ser Ser Gly Ala Leu Ile Phe Glu Asp Val
 1045 1050 1055
 Asn Leu Pro Ser Arg Pro Gln Val Glu Lys Leu Leu Arg Cys Thr Asp
 1060 1065 1070
 Asn Ile Phe Thr Phe Ile Phe Leu Leu Glu Met Ile Leu Lys Trp Val
 1075 1080 1085
 Ala Phe Gly Phe Arg Arg Tyr Phe Thr Ser Ala Trp Cys Trp Leu Asp
 1090 1095 1100
 Phe Leu Ile Val Val Val Ser Val Leu Ser Leu Met Asn Leu Pro Ser
 1105 1110 1115 1120
 Leu Lys Ser Phe Arg Thr Leu Arg Ala Leu Arg Pro Leu Arg Ala Leu
 1125 1130 1135
 Ser Gln Phe Glu Gly Met Lys Val Val Val Tyr Ala Leu Ile Ser Ala
 1140 1145 1150
 Ile Pro Ala Ile Leu Asn Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Phe Trp Leu
 1155 1160 1165
 Val Phe Cys Ile Leu Gly Val Asn Leu Phe Ser Gly Lys Phe Gly Arg
 1170 1175 1180
 Cys Ile Asn Gly Thr Asp Ile Asn Met Tyr Leu Asp Phe Thr Glu Val

2771103

13/27

1185

1190

1195

1200

Pro Asn Arg Ser Gln Cys Asn Ile Ser Asn Tyr Ser Trp Lys Val Pro

1205

1210

1215

14/27
Figure 2E: SEQ ID NO: 2

Gln Val Asn Phe Asp Asn Val Gly Asn Ala Tyr Leu Ala Leu Leu Gln
 1220 1225 1230
 Val Ala Thr Tyr Lys Gly Trp Leu Glu Ile Met Asn Ala Ala Val Asp
 1235 1240 1245
 Ser Arg Glu Lys Asp Glu Gln Pro Asp Phe Glu Ala Asn Leu Tyr Ala
 1250 1255 1260
 Tyr Leu Tyr Phe Val Val Phe Ile Ile Phe Gly Ser Phe Phe Thr Leu
 1265 1270 1275 1280
 Asn Leu Phe Ile Gly Val Ile Ile Asp Asn Phe Asn Gln Gln Lys
 1285 1290 1295
 Lys Leu Gly Gly Gln Asp Ile Phe Met Thr Glu Glu Gln Lys Lys Tyr
 1300 1305 1310
 Tyr Asn Ala Met Lys Lys Leu Gly Thr Lys Lys Pro Gln Lys Pro Ile
 1315 1320 1325
 Pro Arg Pro Leu Asn Lys Cys Gln Ala Phe Val Phe Asp Leu Val Thr
 1330 1335 1340
 Ser Gln Val Phe Asp Val Ile Ile Leu Gly Leu Ile Val Leu Asn Met
 1345 1350 1355 1360
 Ile Ile Met Met Ala Glu Ser Ala Asp Gln Pro Lys Asp Val Lys Lys
 1365 1370 1375
 Thr Phe Asp Ile Leu Asn Ile Ala Phe Val Val Ile Phe Thr Ile Glu
 1380 1385 1390
 Cys Leu Ile Lys Val Phe Ala Leu Arg Gln His Tyr Phe Thr Asn Gly
 1395 1400 1405
 Trp Asn Leu Phe Asp Cys Val Val Val Leu Ser Ile Ile Ser Thr
 1410 1415 1420
 Leu Val Ser Arg Leu Glu Asp Ser Asp Ile Ser Phe Pro Pro Thr Leu
 1425 1430 1435 1440
 Phe Arg Val Val Arg Leu Ala Arg Ile Gly Arg Ile Leu Arg Leu Val
 1445 1450 1455
 Arg Ala Ala Arg Gly Ile Arg Thr Leu Leu Phe Ala Leu Met Met Ser
 1460 1465 1470
 Leu Pro Ser Leu Phe Asn Ile Gly Leu Leu Leu Phe Leu Val Met Phe
 1475 1480 1485
 Ile Tyr Ala Ile Phe Gly Met Ser Trp Phe Ser Lys Val Lys Lys Gly

2771103

1490 1495 1500
1505 1510 1515 1520
Ser Gly Ile Asp Asp Ile Phe Asn Phe Glu Thr Phe Thr Gly Ser Met

16/27
Figure 2F: SEQ ID NO: 2

Leu Cys Leu Phe Gln Ile Thr Thr Ser Ala Gly Trp Asp Thr Leu Leu
1525 1530 1535
Asn Pro Met Leu Glu Ala Lys Glu His Cys Asn Ser Ser Ser Gln Asp
1540 1545 1550
Ser Cys Gln Gln Pro Gln Ile Ala Val Val Tyr Phe Val Ser Tyr Ile
1555 1560 1565
Ile Ile Ser Phe Leu Ile Val Val Asn Met Tyr Ile Ala Val Ile Leu
1570 1575 1580
Glu Asn Phe Asn Thr Ala Thr Glu Glu Ser Glu Asp Pro Leu Gly Glu
1585 1590 1595 1600
Asp Asp Phe Glu Ile Phe Tyr Glu Val Trp Glu Lys Phe Asp Pro Glu
1605 1610 1615
Ala Ser Gln Phe Ile Gln Tyr Ser Ala Leu Ser Asp Phe Ala Asp Ala
1620 1625 1630
Leu Pro Glu Pro Leu Arg Val Ala Lys Pro Asn Lys Phe Gln Phe Leu
1635 1640 1645
Val Met Asp Leu Pro Met Val Met Gly Asp Arg Leu His Cys Met Asp
1650 1655 1660
Val Leu Phe Ala Phe Thr Thr Arg Val Leu Gly Asp Ser Ser Gly Leu
1665 1670 1675 1680
Asp Thr Met Lys Thr Met Met Glu Glu Lys Phe Met Glu Ala Asn Pro
1685 1690 1695
Phe Lys Lys Leu Tyr Glu Pro Ile Val Thr Thr Lys Arg Lys Glu
1700 1705 1710
Glu Glu Gln Gly Ala Ala Val Ile Gln Arg Ala Tyr Arg Lys His Met
1715 1720 1725
Glu Lys Met Val Lys Leu Arg Leu Lys Asp Arg Ser Ser Ser His
1730 1735 1740
Gln Val Phe Cys Asn Gly Asp Leu Ser Ser Leu Asp Val Ala Lys Val
1745 1750 1755 1760
Lys Val His Asn Asp
1765

17 / 27

Figure 2G: SEQ ID NO:2

1 MEERYYPVIF PDERNFRPFT SDSLAAIEKR IAIQKERKKS KDKAAAEPQP
O
51 RPQLDLKASR KLPKLYGDI PELVAKPLED LDPFYKDHT FMVLNKKRTI
O
101 YRFSAKRALF ILGPFNPLRS LMIRISVHSV FSMFIICTVI INCMFMANSM
|-----|-----|
151 ERSFDNDIPE YVFIGIYILE AVIKILARGF IVDEFSFLRD PWNLDFIVI
|-----|-----|-----|
201 GTAIATCFPG SQVNLSALRT FRVFRALKAI SVISGLKVIV GALLRSVKKL
-----| . |-----|-----|
251 VDVMVLTLC LSIFALVGQQ LFMGILNQKC IKHNCGPNPA SNKDCFEKEK
|-----|-----|
301 DSEDFIMCGT WLGSRPCPNG STCDKTTLNP DNNTYTKFDNF GWSFLAMFRV
• •
351 MTQDSWERLY RQILRTSGIY FVFFFVVVIF LGSFYLLNLT LAVVTMAYEE
+ |-----|-----|
401 QNRNVAEETE AKEKMFQEAQ QLLREEKEAL VAMGIDRSSL NSLQASSFSP
451 KKRKFFGSKT RKSFFMRGSK TAQASASDSE DDASKNPQLL EQTKRLSQNL
O
501 PVDLFDEHVD PLHRQRALSA VSILTITMQE QEKFQEPCFP CGKNLASKYL
551 VWDCSPQWLC IKKVLRTIMT DPFTELAITI CIIINTVFLA VEHHNMDNL
|-----|-----|
601 KTILKIGNWV FTGIFIAEMC LKIIALDPYH YFRHGWNVFD SIVALLSLAD
|-----|-----|
651 VLYNTLSDNN RSFLASLRVL RVFKLAKSWP TLNTLIKIIG HSVGALGNLT
----| . |-----|-----|
701 VVLTIVVFIF SVVGMRLEFGT KFNKTAYATQ ERPRRRWHMD NFYHSFLUVF
----|-----|
751 RILCGEWIEN MWGCMQDMGD SPLCIIVFVL IMVICKLVVL NLFIALLNS
|-----|-----|
801 FSNEEKDGSL EGETRKTKVQ LALDRFRRAF SFMLHALQSF CCKKCRKNS
O
851 PKPKETTESF AGENKDSILP DARPWKEYDT DMALYTGQAG APLAPLAEEV
901 DDVEYCGEGG ALPTSQHSAG VQAGDLPPET KQLTSPDDQG VEMEVFSEED
951 LHLSIQSPRK KSDAVSMLSE CSTIDLNDIF RNLQKTVSPK KQPDRCFPKG
O
1001 LSCHFLCHKT DKRKSPWVLW WNIRKTCYQI VKHHSWFESFI IFVILLSSGA
|-----|-----|
1051 LIFEDVNLPs RPQVEKLLRC TDNIFTFIFL LEMILKWVAF GFRRYFTSAW
--| |-----|-----|-----|
1101 CWLDFLIVVV SVLSLMNLPs LKSFRTRLAL RPLRALSQFE GMKVVVYALI
---|-----| |-----|-----|
1151 SAIPAILNVL LVCLIFWLVF CILGVNLFSG KFGRCINGTD INMYLDFTEV
|-----|-----|
1201 PNRSQLCNISN YSWKVPQVNF DNVGNAYLAL LQVATYKGWL EIMNAAVDSR
• • •
1251 EKDEQPDPFEA NLYAYLYFVV FIIFGSFFTl NLFIGVIIDN FNQQQKKLGG
|-----|-----|

18/27
Figure 2H: SEQ ID NO: 2

1301 QDIFMTEEQK KYYNAMKKLG TKKPQKPIPR PLNKCQAFVF DLVTSQVFDV |-----
1351 IILGLIVLNM IIMMAESADQ PKDVKKTFDI LNIAFVVIFT IECLIKVFAL |-----
IVS1-----| |-----IVS2-----|
1401 RQHYFTNGWN LFDCVVVVLIS IISTLVSRL ESDISFPPTL FRVVRLARIG |-----
|-----IVS3-----| |-----
1451 RILRLVRAAR GIRTLLFALM MSLPSLFNIG LLLFLVMFIY AIFGMSWFSK |-----
IVS4-----| |-----IVS5-----
1501 VKKGSGIDDI FNFETFTGSM LCLFQITTSA GWDTLLNPML EAKEHCNSSS |-----
| O
1551 QDSCQQPQIA VVYFVSYIII SFLIVVNMYI AVILENFNTA TEESEDPLGE |-----
|-----IVS6-----|
1601 DDFEIFYEVW EKFDPEASQF IQYSALSDFA DALPEPLRVA KPNKFQFLVM
1651 DLPMVMGDRL HCMDVLFATT TRVLGDSSGL DTMKTMMEEK FMEANPFKKL
1701 YEPIVTTTKR KEEEQGAavi QRAYRKHMEK MVKLSLKDRS SSSHQVFCNG
1751 DLSSLDVAKV KVHND*

19/27

Figure 3A: SEQ ID NO:3

1 GCTGAGCAGT GGGCACTGA TATTTGAAGA TGTTCACCTT GAGAACCAAC
51 CCAAAATCCA AGAATTACTA AATTGTACTG ACATTATTTT TACACATATT
101 TTTATCCTGG AGATGGTACT AAAATGGTA GCCTTCGGAT TTGGAAAGTA
151 TTTCACCAGT GCCTGGTGCT GCCTTGATTT CATCATTGTG ATTGTCTCTG
201 TGACCACCCCT CATTAACCTTA ATGGAATTGA AGTCCTTCCG GACTCTACGA
251 GCACTGAGGC CTCTTCGTGC GCTGTCCCAG TTTGAAGGAA TGAAGGTGGT
301 GGTCAATGCT CTCATAGGTG CCATACCTGC CATTCTGAAT GTTTGCTTG
351 TCTGCCTCAT TTTCTGGCTC GTATTTGTA TTCTGGAGT ATACTTCTTT
401 TCTGGAAAAT TTGGGAAATG CATTAATGGA ACAGACTCAG TTATAAATTA
451 TACCATCATT ACAAAATAAA GTCAATGTGA AAGTGGCAAT TTCTCTTGGG
501 TCAACCAGAA AGTCAACTTT GACAATGTGG GAAATGCTTA CCTCGCTCTG
551 CTGCAAGTGG CAACATTAA GGGCTGGATG GATATTATAT ATGCAGCTGT
601 TGATTCCACA GAGAAAGAAC AACAGCCAGA GTTTGAGAGC AATTCACTCG
651 GTTACATTAA CTTCGTAGTC TTTATCATCT TTGGCTCATT CTTCACTCTG
701 AATCTCTTCA TTGGCGTTAT CATTGACAAC TTCAACCAAC AGCAGAAAAA
751 GTTAGGTGGC CAAGACATTT TTATGACAGA AGAACAGAAG AAATACTATA
801 ATGCAATGAA AAAATTAGGA TCCAAAAAAC CTCAAAAACC CATTCCACGG
851 CCCGTT

20/27
Figure 3B: SEQ ID NO:3

(Ligne supérieure: PNS humain)
(Ligne inférieure: PNS de rat)

1 LSSGA 5
1001 LSCHFLCHKTDKRKSPWVLWWNIRKTCYQIVKHSWFESFIIFVILLSSGA 1050
6 LIFEDVHLENQPKIQELLNCTDIIFTHIFILEMVLKWVAFGFGKYFTSAW 55
1051 LIFEDVNLPSPRQVEKLLRCTDNIFTFIFLLEMILKWVAFGFRRYFTSAW 1100
56 CCLDFIIVIVSVTTLINLMELKSFRTLRALRPLRALSQFEGMKVVNALI 105
1101 CWLDFLIVVVSVLSLMNLPSLKSFRTLRALRPLRALSQFEGMKVVVYALI 1150
106 GAIPAILNVLLVCLIFWLVCILGVYFFSGKFGKCINGTD..SVINYTII 153
1151 SAIPAILNVLLVCLIFWLVCILGVNLFSGKFGRCINGTDINMYLDFTEV 1200
154 TNKSQCESGNFSWINQKVNFNDNVGNAYLALLQVATFKGWMIDIYAAVDST 203
1201 PNRSQCNISNYSWKVPQVNFDNVGNAYLALLQVATYKGWLEIMNAAVDSR 1250
204 EKEQQPEFESNSLGYIYFVVFIIIFGSFFTTLNLFIGVIIDNFNQQQKKLGG 253
1251 EKDEQPDPFEANLYAYLYFVVFIIIFGSFFTTLNLFIGVIIDNFNQQQKKLGG 1300
254 QDIFMTEEQQKYYNAMKKLGSKKPQKPIPRPV..... 285
1301 QDIFMTEEQQKYYNAMKKLGTKKPQKPIPRPLNKCQAFVFDLVTSQVFDV 1350

Figure 4: SEQ ID NO:4

1 CTCAACATGG TTACGATGAT GGTGGAGACC GACGAGCAGG GCGAGGAGAA
51 GACGAAGGTT CTGGGCAGAA TCAACCAGTT CTTTGTGGCC GTCTTCACGG
101 GCGAGTGTGT GATGAAGATG TTCGCCCTGC GACAGTACTA TTTCACCAAC
151 GGCTGGAACG TGTTCGAcTT CATAGTGGTG ATCCTGTCCA TTGGGAGTCT
201 GCTGTTCT GCAATCCTTA AGTCACTGGA AAACTACTTC TCCCCGACGC
251 TCTTCCGGGT CATCCGTCTG GCCAGGATCG GCCGCATCCT CAGGCTGATC
301 CGAGCAGCCA AGGGGATTCTG CACGCTGCTC TTCGCCCTCA TGATGTCCCT
351 GCCCGCCCTC TTCAACATCG GCCTCCTCCT CTTCCCTCGtC ATGTTCATCT
401 ACTCCATCTT CGGCATGGCC AGCTTCGCTA ACGTCGTGGA CGAGGCCGGC
451 ATCGACGACA TGTTCAACTT CAAGACCTTT GGCAACAGCA TGCTGTGCCT
501 GTTCCAGATC ACCACCTCGG CCGGCTGGGA CGGCCTCCTC AGCCCCATCC
551 TCAACACGGG GCCTCCCTAC TGCGACCCCA ACCTGCCCAA CAGCAACGGC
601 TCCCGGGGGA ACTGCGGGAG CCCGGCGGTG GGCATCATCT TCTTCACCAC
651 CTACATCATC ATCTCCTTCC TCATCGTGGT CAACATGTAT ATCGCAGTCA
701 TC

Figure 5A: SEQ ID NO: 5

1 GTCGACTCTA GATCAGGGTG AAGATGGAGG AGAGGTACTA CCCGGTGATC
51 TTCCCGGACG AGCGGAATT TT CCGCCCCCTTC ACTTCCGACT CTCTGGCTGC
101 CATAGAGAAAG CGGATTGCTA TCCAAAAGGA GAGGAAGAAG TCCAAAGACA
151 AGGCAGGCAGC TGAGCCCCAG CCTCGGCCTC AGCTTGACCT AAAGGCCTCC
201 AGGAAGTTAC CTAAGCTTTA TGGTGACATT CCCCCTGAGC TTGTAGCGAA
251 GCCTCTGGAA GACCTGGACC CATTCTACAA AGACCATAAG ACATTCACTGG
301 TGGTGAACAA GAAGAGAACAA ATTTATCGCT TCAGCGCCAA GCAGGGCCTTG
351 TTCATTCTGG GGCCCTTTAA TCCCCTCAGA AGCTTAATGA TTCGTATCTC
401 TGTCCATTCA GTCTTAGCA TGTTCATCAT CTGCACGGTG ATCATCAACT
451 GTATGTTCAT GGCGAATTCT ATGGAGAGAA GTTTCGACAA CGACATTCCC
501 GAATACGTCT TCATTGGGAT TTATATTTA GAAGCTGTGA TTAAAATATT
551 GGCAAGAGGC TTCATTGTGG ATGAGTTTC CTTCCCTCCGA GATCCGTGGA
601 ACTGGCTGGA CTTCATTGTC ATTGGAACAG CGATCGAAC TTGTTTCCG
651 GGCAGCCAAG TCAATCTTC AGCTCTCGT ACCTTCCGAG TGTTCAGAGC
701 TCTGAAGGCG ATTCAGTTA TCTCAGGTCT GAAGGTCATC GTAGGTGCC
751 TGCTGCGCTC GGTGAAGAACAG CTGGTAGACG TGATGGTCCT CACTCTCTC
801 TGCCCTCAGCA TCTTGCCCT GGTCGGTCAG CAGCTGTTCA TGGGAATTCT
851 GAACCAGAACAG TGTATTAAGC ACAACTGTGG CCCCAACCCCT GCATCCAACA
901 AGGATTGCTT TGAAAAGGAA AAAGATAGCG AAGACTTCAT AATGTGTGGT
951 ACCTGGCTCG GCAGCAGACC CTGTCCAAT GGTTCTACGT GCGATAAAAC
1001 CACATTGAAC CCAGACAATA ATTATACAAA GTTGACAAC TTTGGCTGGT
1051 CCTTTCTCGC CATGTTCCGG GTTATGACTC AAGACTCCTG GGAGAGGCTT
1101 TACCGACAGA TCCTGCGGAC CTCTGGATC TACTTTGTCT TCTTCTCGT

23/27

Figure 5B: SEQ ID NO: 5

1151 GGTGGTCATC TTCCTGGCT CCTTCTACCT GCTTAACCTA ACCCTGGCTG
1201 TTGTCACCAT GGCTTATGAA GAACAGAAC AAAATGTAGC TGCTGAGACA
1251 GAGGCCAAGG AGAAAATGTT TCAGGAAGCC CAGCAGCTGT TAAGGGAGGA
1301 GAAGGAGGCT CTGGTTGCCA TGGGAATTGA CAGAAGTTCC CTTAATTCCC
1351 TTCAAGCTTC ATCCTTTCC CGAAGAAC GGAAGTTTT CGGTAGTAAG
1401 ACAAGAAAGT CCTTCTTTAT GAGAGGGTCC AAGACGGCCC AAGCCTCAGC
1451 GTCTGATTCA GAGGACGATG CCTCTAAAAA TCCACAGCTC CTTGAGCAGA
1501 CCAAACGACT GTCCCAGAAC TTGCCAGTGG ATCTCTTGA TGAGCACGTG
1551 GACCCCCCTCC ACAGGCAGAG AGCGCTGAGC GCTGTCAGTA TCTTAACCAT
1601 CACCATGCAG GAACAAGAAA AATTCCAGGA GCCTTGTTTC CCATGTGGGA
1651 AAAATTGCG CTCTAAGTAC CTGGTGTGGG ACTGTAGCCC TCAGTGGCTG
1701 TGCATAAAGA AGGTCCCTGCG GACCATCATG ACGGATCCCT TTACTGAGCT
1751 GCCCATCACC ATCTGCATCA TCATCAATAC CGTTTCTTA GCCGTGGAGC
1801 ACCACAAACAT GGATGACAAC TTAAAGACCA TACTGAAAAT AGGAAACTGG
1851 GTTTTCACGG GAATTTCAT AGCGGAAATG TGTCTCAAGA TCATCGCGCT
1901 CGACCCTTAC CACTACTTCC GGCACGGCTG GAATGTTTT GACAGCATCG
1951 TGGCCCTCCT GAGTCTCGCT GATGTGCTCT ACAACACACT GTCTGATAAC
2001 AATAGGTCTT TCTTGGCTTC CCTCAGAGTG CTGAGGGTCT TCAAGTTAGC
2051 CAAATCCTGG CCCACGTTAA AACTCTCAT TAAGATCATC GCCCACTCCG
2101 TGGGCGCGCT TGGAAACCTG ACTGTGGTCC TGACTATCGT GGTCTTCATC
2151 TTTTCTGTGG TGGGCATGCG GCTCTCGGC ACCAAGTTA ACAAGACCGC
2201 CTACGCCACC CAGGAGCGGC CCAGGGCGCG CTGGCACATG GATAATTCT
2251 ACCACTCCTT CCTGGTGGTG TTCCGCATCC TCTGTGGGGA ATGGATCGAG
2301 AACATGTGGG GCTGCATGCA GGATATGGAC GGCTCCCCGT TGTGCATCAT

24/27
Figure 5C: SEQ ID NO: 5

2351 TGTCTTGTC CTGATAATGG TGATCGGGAA GCTTGTGGTG CTTAACCTCT
2401 TCATTGCCCTT GCTGCTCAAT TCCTTCAGCA ATGAGGAGAA GGATGGGAGC
2451 CTGGAAGGAG AGACCAGGAA AACCAAAGTG CAGCTAGCCC TGGATCGGTT
2501 CCGCCGGGCC TTCTCCTTCA TGCTGCACGC TCTTCAGAGT TTTTGTGCA
2551 AGAAAATGCAG GAGGAAAAAC TCGCCAAAGC CAAAAGAGAC AACAGAAAGC
2601 TTTGCTGGTG AGAATAAAGA CTCAATCCTC CCGGATGCGA GGCCCTGGAA
2651 GGAGTATGAT ACAGACATGG CTTTGTACAC TGGACAGGCC GGGGCTCCGC
2701 TGGCCCCACT CGCAGAGGTA GAGGACGATG TGGAATATTG TGGTGAAGGC
2751 GGTGCCCTAC CCACCTCACA ACATAGTGCT GGAGTTCAAGG CCGGTGACCT
2801 CCCTCCAGAG ACCAAGCAGC TCACTAGCCC GGATGACCAA GGGGTTGAAA
2851 TGGAAGTATT TTCTGAAGAA GATCTGCATT TAAGCATACA GAGTCCTCGA
2901 AAGAAGTCTG ACGCAGTGAG CATGCTCTCG GAATGCAGCA CAATTGACCT
2951 GAATGATATC TTTAGAAATT TACAGAAAAC AGTTTCCCCC AAAAAGCAGC
3001 CAGATAGATG CTTTCCAAG GGCCTTAGTT GTCACTTTCT ATGCCACAAA
3051 ACAGACAAGA GAAAGTCCCC CTGGGTCCCTG TGGTGGAAACA TTCGGAAAAC
3101 CTGCTACCAA ATCGTGAAGC ACAGCTGGTT TGAGAGTTTC ATAATCTTG
3151 TTATTCTGCT GAGCAGTGGA GCGCTGATAT TTGAAGATGT CAATCTCCCC
3201 AGCCGGCCCC AAGTTGAGAA ATTACTAAGG TGTACCGATA ATATTTCAC
3251 ATTTATTTTC CTCCTGGAAA TGATCCTGAA GTGGGTGGCC TTTGGATTCC
3301 GGAGGTATTT CACCAGTGCC TGGTGCTGGC TTGATTTCT CATTGTGGTG
2251 GTGTCTGTGC TCAGTCTCAT GAATCTACCA AGCTTGAAGT CCTTCCGGAC
3401 TCTGCGGGCC CTGAGACCTC TGCGGGCGCT GTCCCAGTTT GAAGGAATGA
3451 AGGTTGTCGT CTACGCCCTG ATCAGCGCCA TACCTGCCAT TCTCAATGTC
3501 TTGCTGGTCT GCCTCATTCTT CTGGCTCGTA TTTTGTATCT TGGGAGTAAA

25/27
Figure 5D: SEQ ID NO: 5

3551 TTTATTTCT GGGAGTTG GAAGGTGCAT TAACGGGACA GACATAAATA
3601 TGTATTTGGA TTTTACCGAA GTTCCGAACC GAAGCCAATG TAACATTAGT
3651 AATTACTCGT GGAAGGTCCC GCAGGTCAAC TTTGACAACG TGGGGAAATGC
3701 CTATCTGCC CTGCTGCAAG TGGCAACCTA TAAGGGCTGG CTGGAAATCA
3751 TGAATGCTGC TGTGATTCC AGAGAGAAAG ACGAGCAGCC GGACTTTGAG
3801 GCGAACCTCT ACGCGTATCT CTACTTTGTG GTTTTTATCA TCTTCGGCTC
3851 CTTCTTACC CTGAACCTCT TTATCGGTGT TATTATTGAC AACCTCAATC
3901 AGCAGCAGAA AAAGTTAGGT GGCCAAGACA TCTTCATGAC TGAGGAGCAG
3951 AAGAAATATT ACAATGCAAT GAAAAAGTTA GGAACCAAGA AACCTCAAAA
4001 GCCCATCCCA AGGCCCTGA ACAAAATGTCA AGCCTTGTTG TTCGACCTGG
4051 TCACAAGCCA GGTCTTGAC GTCATCATTG TGGGTCTTAT TGTCTTAAAT
4101 ATGATTATCA TGATGGCTGA ATCTGCCGAC CAGCCAAAG ATGTGAAGAA
4151 AACCTTGAT ATCCTCAACA TAGCCTCGT GGTCACTTT ACCATAGAGT
4201 GTCTCATCAA AGTCTTGCT TTGAGGCAAC ACTACTCAC CAATGGCTGG
4251 AACTTATTTG ATTGTGTGGT CGTGGTTCTT TCTATCATTA GTACCCCTGGT
4301 TTCCCGCTTG GAGGACAGTG ACATTTCTTT CCCGCCACG CTCTTCAGAG
4351 TCGTCCGCTT GGCTCGGATT GGTCGAATCC TCAGGCTGGT CCAGGGCTGCC
4401 CGGGGAATCA GGACCCCTCCT CTTGCTTTG ATGATGTCTC TCCCCCTCTCT
4451 CTTCAACATC GGTCTGCTGC TCTTCCTGGT GATGTTCATT TACGCCATCT
4501 TTGGGATGAG CTGGTTTCC AAAGTGAAGA AGGGCTCCGG GATCGACGAC
4551 ATCTTCAACT TCGAGACCTT TACGGGCAGC ATGCTGTGCC TCTTCCAGAT
4601 AACCACTTCG GCTGGCTGGG ATACCCCTCCT CAACCCCATG CTGGAGGCAA
4651 AAGAACACTG CAACTCCTCC TCCCAAGACA GCTGTCAGCA GCCGCAGATA
4701 GCCGTCGTCT ACTTCGTCAG TTACATCATT ATCTCCTTCC TCATCGTGGT

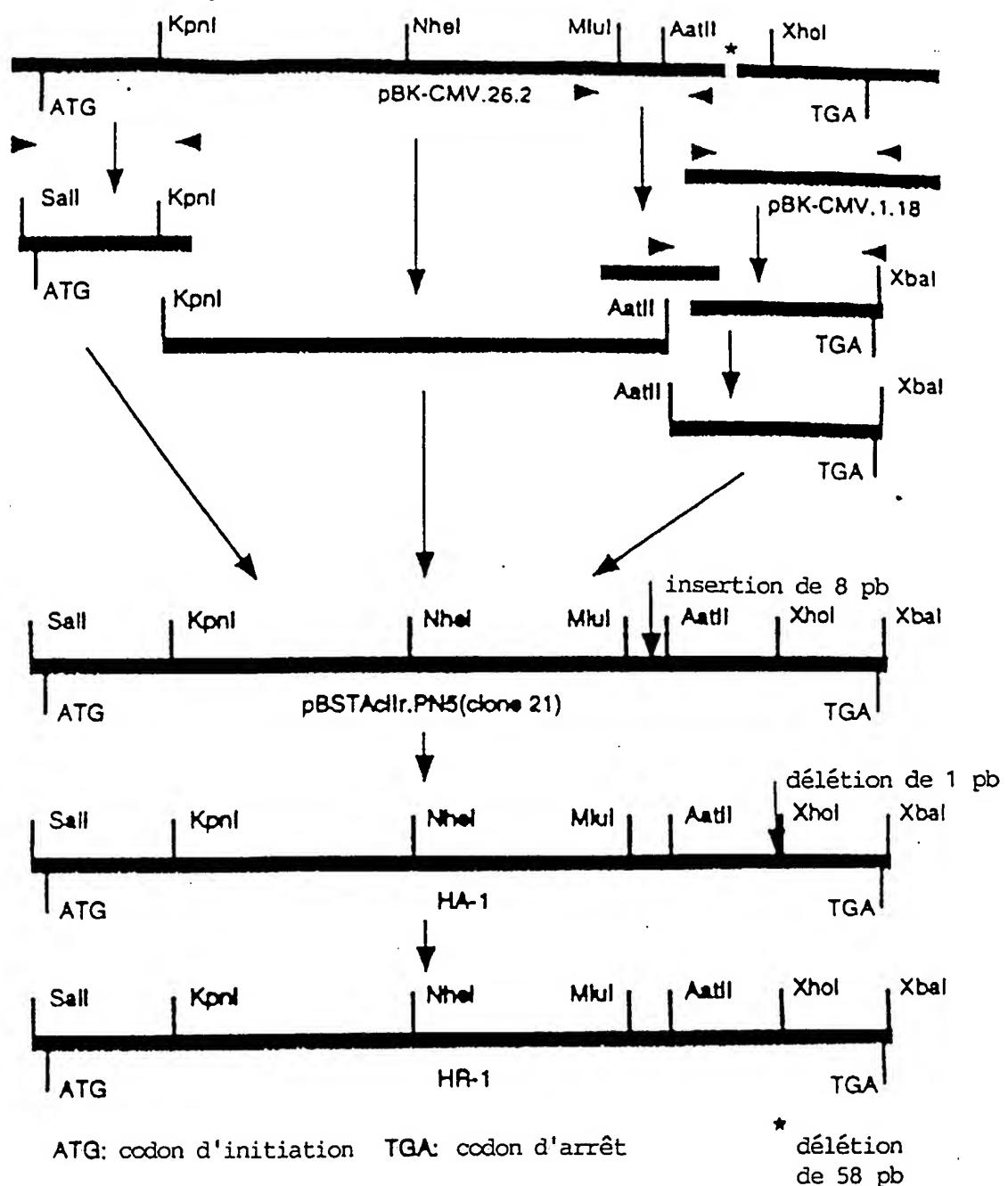
2771103

26/27

Figure 5E: SEQ ID NO: 5

4751 CAACATGTAC ATCGCTGTGA TCCTCGAGAA CTTCAACACA GCCACGGAGG
4801 AGAGCGAGGA CCCTCTGGGA GAGGACGACT TTGAAATCTT CTATGAGGTC
4851 TGGGAGAAGT TTGACCCCGA GGCGTCGCAG TTCATCCAGT ATTCCGGCCCT
4901 CTCTGACTTT GCGGACGCC CGCCGGAGCC GTTGCCTGTG GCCAAGCCGA
4951 ATAAGTTCA GTTTCTAGTG ATGGACTTGC CCATGGTGAT GGGCGACCGC
5001 CTCCATTGCA TGGATGTTCT CTTTGCTTTC ACTACCAGGG TCCTCGGGGA
5051 CTCCAGCGGC TTGGATACCA TGAAAACCAT GATGGAGGAG AAGTTTATGG
5101 AGGCCAACCC TTTTAAGAAG CTCTACGAGC CCATAGTCAC CACCACCAAG
5151 AGGAAGGAGG AGGAGCAAGG CGCCGCCGTC ATCCAGAGGG CCTACCGGAA
5201 ACACATGGAG AAGATGGTCA AACTGAGGCT GAAGGACAGG TCAAGTTCAT
5251 CGCACCAAGGT GTTTGCAAT GGAGACTTGT CCAGCTTGGA TGTGGCCAAG
5301 GTCAAGGTTCA ACAATGACTG AACCCCTCATC TAGA

Figure 6



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.